



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA**

DIRK GERHARD PETZSCH

**Avaliação pré-clínica da atividade do tipo antidepressiva de
quatro preparações comerciais de *Hypericum perforatum* e a
sua correlação com os teores de hiperforina**

Florianópolis

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

DIRK GERHARD PETZSCH

**Avaliação pré-clínica da atividade do tipo antidepressiva de
quatro preparações comerciais de *Hypericum perforatum* e a
sua correlação com os teores de hiperforina**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thereza Christina
Monteiro de Lima**

Florianópolis

2009

PETZSCH, DIRK GERHARD. **Avaliação pré-clínica da atividade do tipo antidepressiva de quatro preparações comerciais de *Hypericum perforatum* e a sua correlação com os teores de hiperforina.** Florianópolis, 2009, 77 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Defesa: 26/02/2009

O presente trabalho investigou os efeitos comportamentais e os constituintes químicos de quatro preparações comerciais de *Hypericum perforatum*. Camundongos adultos foram previamente tratados por via oral (v.o.) com as quatro preparações comerciais de *H. perforatum* (erva-de-São-João) e, 90 min após, submetidos aos modelos de natação forçada (TNF), suspensão pela cauda (TSC) e campo-aberto (CA), a fim de avaliar possíveis atividades centrais, em especial a antidepressiva. Todas as preparações testadas foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade tanto no TNF, quanto no TSC, confirmando seu efeito antidepressivo, sem diferenças significantes entre as diferentes preparações comerciais. Este efeito parece ser específico, pois não foram observadas mudanças nos animais tratados e submetidos ao CA teste que avalia a atividade motora dos animais. A análise química mostra a presença de diversos constituintes como diferentes flavonóides e hiperforina, mas a atividade farmacológica observada não se correlaciona diretamente com quaisquer destas substâncias. Sugere-se, então, que o efeito antidepressivo das quatro preparações comerciais de *H. perforatum* depende da presença de diferentes constituintes químicos e não necessariamente da presença de hiperforina.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos:

- à Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, pela orientação e apoio durante do programa e além.
- ao Dr. Gustavo Micke, pelo apoio e disponibilidade na análise química
- ao Dr. Jamil Assreuy, pelo apoio e orientação na logística do meu mestrado
- à Rebeca Marques de Carvalho, pelo apoio na realização dos tratamentos para os testes farmacológicos
- à Melina Heller, pelo apoio na análise química
- ao Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals (Karlsruhe, Alemanha), pela doação da hiperforina
- ao Biotério Central, pelos animais
- ao CNPq, pelo apoio financeiro
- à Casa de Oração Maria Marques, e a Verinha e o Lê, por abrir as portas para mim
- ao Mestre Juramidam e todas as plantas de poder, pelos ensinamentos infinitos
- às mulheres na minha vida, por ajudarem a me tornar um homem mais verdadeiro. I love you all!

Dedico esta dissertação ao meu pai, Dr. Dietrich Karl Albert Petzsch, *in memoriam*.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIACÕES	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	1
Depressão – Incidência, patofisiologia e farmacoterapia	2
O uso de plantas medicinais na terapêutica	4
<i>Hypericum perforatum</i> – Histórico, aspectos botânicos, químicos e farmacológicos	5
Importância médica e comercial do <i>H. perforatum</i> – Justificativas do estudo	14
Análise Fitoquímica - A eletroforese capilar (EC)	16
OBJETIVOS	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
Testes Farmacológicos	23
Animais	23
Drogas e reagentes	23
Testes Comportamentais	26
Teste da suspensão pela cauda	26
Teste da natação forçada	27
Teste do campo aberto	28

	Protocolos experimentais	29
	Análise estatística	30
	Análise Fitoquímica	31
	Preparação de amostras e padrões	31
	Equipamento	31
	Condições Experimentais	32
RESULTADOS		33
	Avaliação farmacológica	34
	Teste da suspensão pela cauda	34
	Teste de campo aberto	38
	Teste da natação forçada	40
	Resultados químicos	41
	Curvas de Calibração	41
	Eletroferogramas dos extratos	45
DISCUSSÃO		51
CONCLUSÓES		62
REFERÊNCIAS		64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Hypericum perforatum</i> L.	7
Figura 2. Estrutura química da hipericina e da pseudo-hipericina.	8
Figura 3. Estrutura química da hiperforina e da adhiperforina.	9
Figura 4. Estrutura química de alguns flavonóides presentes no <i>H. perforatum</i> L.	10
Figura 5. Esquema do instrumento de eletroforese capilar.	18
Figura 6. Técnica de administração intragástrica (gavagem) em camundongos.	25
Figura 7. Teste da suspensão pela cauda.	26
Figura 8. Teste da natação forçada.	27
Figura 9. Teste do campo-aberto.	28
Figura 10. Efeito da administração oral de imipramina 30 mg/kg no tempo de imobilidade de camundongos avaliados no teste da suspensão pela cauda.	34
Figura 11. Efeito da administração oral dos extratos A, B, C e D (62,5 mg/kg, 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade de camundongos avaliados no teste da suspensão pela cauda.	35
Figura 12. Efeito da administração oral de imipramina 30 mg/kg na latência para imobilidade de camundongos avaliados no teste de suspensão pela cauda.	37
Figura 13. Efeito da administração oral dos extratos A, B, C e D (62,5 mg/kg, 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg) sobre a latência para imobilidade de camundongos avaliados no teste da suspensão pela cauda.	37
Figura 14. Efeito da administração oral dos extratos A, B, C e D (500 mg/kg) ou imipramina (30 mg/kg) no tempo de imobilidade e na latência para imobilidade de camundongos avaliados no teste de natação forçada.	41

Figura 15. Eletroferograma dos padrões de rutina (A = 99 mg/mL), isoquercitrina (B = 99 mg/mL), quercetina (C = 100 mg/mL) e hiperforina (D = 100 mg/mL).	42
Figura 16. Espectros de UV dos padrões de rutina, isoquercitrina, quercetina e hiperforina.	43
Figura 17. Curvas de calibração para os padrões de rutina, isoquercitrina, quercetina e hiperforina.	44
Figura 18. Eletroferograma do extrato A.	45
Figura 19. Eletroferograma do extrato B.	46
Figura 20. Eletroferograma do extrato C.	46
Figura 21. Eletroferograma do extrato D.	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Número de cruzamentos no teste de campo aberto.	39
Tabela 2. Número de levantamentos no teste de campo aberto.	39
Tabela 3. Concentrações dos padrões injetados em ppm e áreas de picos correspondentes.	43
Tabela 4. Dados das curvas de calibração.	45
Tabela 5. Área dos picos dos flavonóides / hiperforina.	48
Tabela 6. Concentração dos flavonóides / hiperforina nas amostras injetadas (EC) em mg/L.	48
Tabela 7. Porcentagem de flavonóides / hiperforina na massa do produto farmacêutico usada no preparo das amostras.	49
Tabela 8. Porcentagem de flavonóides / hiperforina na massa do extrato de <i>Hypericum</i> .	50
Tabela 9. Massa de flavonóides / hiperforina em mg por comprimento / cápsula.	50
Tabela 10. Resumo de estudos farmacológicos do <i>H. perforatum</i> e dos seus constituintes analisados.	54
Tabela 11. Resumo dos estudos fitoquímicos do <i>H. perforatum</i> e dos seus constituintes analisados.	59

LISTA DE ABREVIações

AHP – *American Herbal Pharmacopoeia*
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária
CA – Campo aberto
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
DM - Depressão maior
EC – Eletroforese capilar
ESJ - Erva-de-São-João
GABA – Ácido gama-aminobutírico
HPLC – *High performance liquid chromatography*
i.p. – Via intraperitoneal
MAOI - Inibidor da enzima monoaminoxidase
NA - Noradrenalina
SJW - *St. John's Wort*
SNC - Sistema nervoso central
SNRIs - Inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina
SSRIs - Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
TCAs - Antidepressivos tricíclicos
TNF – Teste de natação forçada
TSC – Teste de suspensão pela cauda
v.o. – Via oral
WHO - *World Health Organization*
5-HT - Serotonina

RESUMO

Avaliação pré-clínica da atividade do tipo antidepressiva de quatro preparações comerciais de *Hypericum perforatum* e a sua correlação com os teores de hiperforina

Preparações comerciais de *Hypericum perforatum* (erva-de-São-João; ESJ) são bastante populares, de interesse comercial, e são estudadas cientificamente há muitos anos. Por outro lado, há um grande interesse em encontrar alternativas terapêuticas seguras e confiáveis para o tratamento da depressão e, neste contexto, a ESJ tem competido com sucesso pelo *status* de terapia antidepressiva padronizada. Na busca por um princípio ativo que possa ser responsabilizado pela atividade antidepressiva do *Hypericum*, vários compostos, principalmente os naftodiantronas (hipericina e pseudohipericina), o fluoroglicinol hiperforina (e seu derivado adhiperforina), além de diversos flavonóides (rutina, hiperosídeo, isoquercitrina, quercitrina, quercetina) têm sido extensivamente estudados. No entanto, não é possível, até o momento, atribuir a atividade antidepressiva da ESJ a somente um dos constituintes químicos presentes na planta. Na verdade, uma atuação sinérgica dos constituintes mencionados tem sido sugerida, embora os mecanismos de ação farmacológicos exatos ou as proporções ideais de constituintes permaneçam desconhecidos. Inúmeros estudos farmacológicos (pré-clínicos e clínicos) usando extratos totais da planta, assim como frações e constituintes isolados foram feitos nos últimos anos. O presente estudo difere destes estudos porque testa extratos comerciais de ESJ em modelos animais de atividade antidepressiva, em paralelo ao estudo dos constituintes químicos destes fitoterápicos, tentando correlacionar o efeito e os compostos dos produtos (quantitativa e qualitativamente). No estudo farmacológico foram usados dois modelos comportamentais validados para avaliar a atividade antidepressiva dos produtos comerciais, testes estes que predizem o efeito clínico de substâncias de diferentes grupos químicos: o teste da suspensão pela cauda (TSC) e o teste da natação forçada (TNF). Para a análise química e a avaliação quantitativa dos produtos comerciais de ESJ usamos um método de eletroforese capilar não aquoso. Nossos dados confirmam a atividade antidepressiva das quatro preparações comerciais de ESJ (pela redução do tempo de imobilidade em ambos os testes), assim como o perfil dos constituintes ativos de alguns extratos de *Hypericum* encontrados no mercado brasileiro (hiperforina e flavonóides – quercetina, rutina e isoquercitrina). Para verificar a especificidade do efeito observado, a atividade motora dos animais foi avaliada no teste do campo-aberto (CA) imediatamente antes de sua submissão ao TSC. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre o grupo controle e os experimentais em qualquer dos parâmetros observados no CA (locomoção horizontal e vertical), excluindo assim qualquer efeito estimulante (ou atividade sedativa) para os produtos testados. Não observamos diferenças significativas entre os diferentes produtos no que diz respeito à atividade antidepressiva, mas seu perfil fitoquímico é completamente diverso, o que indica que os diversos constituintes (hiperforina, flavonóides, etc) podem estar interagindo sinergicamente para promoção da atividade antidepressiva.

ABSTRACT

Concomitant pharmacological assessment and chemical profiling of four commercial St. John's Wort preparations

Preparations of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort – SJW) have been subject to great popularity, commercial interest and scientific scrutiny for many years. Since the surge in interest to find safe and reliable alternatives to established antidepressant medications, SJW has been successfully competing for the status of a standard antidepressant therapy. In the search for an active principle responsible for the antidepressant activity of *Hypericum*, a number of compounds, namely the naphthodianthrones (hypericin and pseudohypericin), the phloroglucinol hyperforin (and its derivative adhyperforin), and various flavonoids (rutin, hyperoside, isoquercitrin, quercitrin, quercetin) have been extensively researched. It has so far not been possible to attribute the overall antidepressant activity of SJW to any single plant constituent. Instead, a synergistic contribution of the above compounds has been suggested, though the exact pharmacological mechanisms or ideal constituent proportions remain elusive. Countless pharmacological studies (both pre-clinical animal assays and human clinical trials), employing whole plant extracts, as well as isolated fractions, have been conducted in recent years. The present study differed from these works in so far, as we tested commercial SJW extracts in standardized animal models of depression, whilst at the same time correlating observed antidepressant activity to the respective constituent profiles of these phyto-products. To date, no such work has been undertaken in a single study. For the experimental pharmacological work we employed two established (standardized) behavioural models for the evaluation of antidepressant activity, which have been shown to correlate well with the clinical efficacy of the substances under scrutiny: the tail suspension test (TST) and the forced swimming test (FST). For the chemical profiling and quantitative assessment of the commercial SJW products, we employed a modified non-aqueous capillary electrophoresis setup. Our experiments yielded important information with respect to confirm the antidepressant pharmacological activity of actual SJW formulations destined for human administration, as well as profiling the range of active constituents in some *Hypericum* extracts encountered on the Brazilian market today. In order to evaluate the specificity of the observed decreases in immobility, the motor activity of all animals was assessed in the open field test (OFT) immediately before submitting them to the TST. No statistically significant differences between the control and test groups were observed in any of the parameters tested in the OFT (horizontal and vertical locomotion), thus excluding central stimulating (or sedative activity) of the substances tested. There was no significant difference among the products regarding their antidepressant activity, but they presented very distinct chemical profiles, indicating that the pharmacological activity should be attributed to the synergistic action of several constituents.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Depressão – Incidência, patofisiologia e farmacoterapia

A depressão maior (DM) ou depressão unipolar é caracterizada por um humor seriamente deprimido (sentimentos profundos de infelicidade e deslocamento) ou interesse / prazer reduzido nas atividades diárias, e é acompanhada por, pelo menos, quatro sintomas adicionais que incluem mudanças no apetite e no peso corporal, fadiga, agitação psicomotora, insônia ou hipersonia, falta de concentração, sentimentos de desvalia ou culpa, diminuição da libido e pensamentos suicidas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization - WHO*), a prevalência de DM é crescente, sendo estimados 120 milhões de casos (aproximadamente 5,8% dos homens e 9,5% das mulheres) com um episódio depressivo em um dado momento de vida (WHO, 2006). No ano de 2020 espera-se que a DM seja o segundo maior problema de saúde em termos de qualidade de vida da população mundial (MURRAY e LOPEZ, 1997).

A patofisiologia exata dos distúrbios depressivos é ainda pouco entendida. De fato, muito do que é conhecido hoje e as teorias prevalentes são baseadas no estudo dos mecanismos farmacológicos de ação de compostos com atividade antidepressiva conhecida.

A primeira substância antidepressiva foi identificada mais ou menos por acaso na década de 50, durante o estudo de medicamentos usados para o tratamento da tuberculose que pareciam melhorar o humor dos pacientes. Um derivado destes medicamentos, o inibidor da enzima monoaminoxidase (MAOI) iproniazida mostrou sua capacidade de reduzir os sintomas depressivos, constituindo, assim, a primeira farmacoterapia efetiva para este distúrbio (SNYDER, 1986). Logo depois uma segunda classe de substâncias, os antidepressivos tricíclicos (TCA's), inicialmente usados como anti-histamínicos, foram usados na clínica para tratar distúrbios depressivos. Estas substâncias, que não apresentam alguns dos mais sérios efeitos colaterais associados à inibição da MAO, inibem a recaptação de serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) nos terminais sinápticos das sinapses centrais, prolongando a

possibilidade de interação destas monoaminas com seus receptores pós-sinápticos (SNYDER, 1986).

A descoberta dos alvos moleculares para a primeira geração de medicamentos antidepressivos levou ao desenho das drogas da segunda e da terceira geração, tais como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRI) e de noradrenalina (SNRI). Todos estes medicamentos agem pelos mesmos mecanismos biológicos – os sistemas monoaminérgicos. Clinicamente, os novos compostos não são mais eficientes que os antigos, mas produzem menos efeitos colaterais. Estes medicamentos exercem seu efeito antidepressivo por aumentarem a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica, por inibirem sua recaptação, agindo direta ou indiretamente nos sistemas transportadores pré-sinápticos, ou por inibirem a degradação dos neurotransmissores. Muitos estudos pré-clínicos e clínicos claramente implicam os sistemas serotoninérgicos (5HT) e noradrenérgicos (NE) na ação antidepressiva (MANN, 1999; PAUWELS, 2000).

Destas observações, entre outras, nasceu a teoria monoaminérgica da depressão. Esta teoria ainda é a mais aceita para explicar a etiologia e a patogênese da depressão, atribuindo esta psicopatologia a um prejuízo na neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica (e, mais recentemente, dopaminérgica). Este déficit monoaminérgico pode ser resultante de diversos mecanismos, não excludentes entre si: (i) redução da síntese ou degradação precoce dos neurotransmissores, (ii) expressão ou função alteradas dos receptores destes neurotransmissores, e (iii) prejuízo nos sistemas de transdução de sinal ativados pelos receptores pós-sinápticos das monoaminas (URANI et al., 2005).

A teoria monoaminérgica da depressão pode explicar algumas características do distúrbio e é a base dos tratamentos usados há mais de 50 anos, mas não explica por si só sua patogênese. A teoria monoaminérgica também não explica o grande número de pacientes que não respondem aos atuais agentes terapêuticos, nem a demora para o aparecimento da resposta clínica ao tratamento antidepressivo, já que um aumento da transmissão serotoninérgica e noradrenérgica ocorre em horas após o tratamento agudo, mas apenas o tratamento crônico melhora o humor. Estas observações sugerem que alterações na transmissão

monoaminérgica representam somente o início de mudanças plásticas mais lentas, que poderiam subsidiar o início e a reversão dos episódios depressivos. As hipóteses mais recentes tentam implicar as vias de segundos-mensageiros, que poderiam representar o correlato molecular das mudanças plásticas que ocorrem na patogênese e na terapia antidepressiva (URANI et al., 2005).

O uso de plantas medicinais na terapêutica

O uso de plantas medicinais para aliviar sinais e sintomas de várias doenças e promover bem-estar é tão antigo quanto a própria humanidade, e as plantas medicinais dominaram as farmacopéias até o surgimento da medicina bioquímica moderna no final do século 19, que levou a um rápido declínio do herbalismo, principalmente nas nações industrializadas do Ocidente.

O herbalismo médico quase desapareceu dos países de língua inglesa, sobrevivendo apenas em grupos isolados nos Estados Unidos e no Reino Unido, desempenhando apenas um papel na manutenção de suas tradições (ERNST, 2005). Uma exceção digna de nota é o *National Institute of Medical Herbalists* (estabelecido no Reino Unido em 1872), a mais antiga e influente associação profissional de herbalistas em atuação no Ocidente, que tem dado suporte e mantido viva a tradição herbalista com vários programas de graduação e pós-graduação em *Herbal Medicine* no Reino Unido nos últimos 10 anos.

Alguns países europeus, como a Alemanha e outros países da região dos Alpes, preservaram um certo nível de herbalismo, conjuntamente com o novo sistema médico dominante, que continuou a coexistir com a farmacologia moderna até os dias de hoje, embora em pequena escala (ERNST, 2005).

Por outro lado, muitas nações em desenvolvimento do Oriente (como a China e a Índia, por exemplo) preservaram seus sistemas tradicionais sofisticados de medicina herbária que são hoje praticados lado a lado com a medicina convencional moderna nestes países.

Apesar do domínio geral da medicina moderna, a medicina natural continua a desempenhar papel crucial na manutenção da saúde da população, especialmente em áreas de menor desenvolvimento sócio-econômico (ZOLLA, 1980; ARNOLD e

GULUMIAN, 1984). O estado do herbalismo médico no Ocidente tem mudado nos últimos 15 anos, com um grande ressurgimento do interesse nesta arte milenar de cura, o que se deve, em parte, a cada vez mais crescente demanda pública por mais cuidados de saúde, devido a sua insatisfação com as práticas médicas convencionais e aos medicamentos prescritos. Há, assim, uma demanda por alternativas mais seguras e naturais que as drogas sintéticas que, entretanto, é geralmente aumentada pela crença errônea de que todos os medicamentos naturais são intrinsecamente seguros.

***Hypericum perforatum* – Histórico, aspectos botânicos, químicos e farmacológicos**

Classificação e histórico

- Nome científico: ***Hypericum perforatum* L.**
- Nomes populares: hipérico, orelha-de-gato, alecrim-bravo, arruda-de-São-Paulo, arruda-do-campo, milfurada, erva-de-São-João e *St. John`s Wort*.
- Período de colheita: antes ou durante a florescência (BILIA et al., 2002).
- Partes utilizadas: as preparações farmacêuticas mais comuns são feitas a partir das partes aéreas da planta (MENNINI e GOBBI, 2004).

O *Hypericum* tem sido usado medicinalmente desde a antiguidade, e muitos médicos eminentes da antiga Grécia e Roma (incluindo Hipócrates, Dióscorides e Galeno) relataram as qualidades terapêuticas desta planta, com uma referência particular à cura de feridas, propriedades analgésicas e diuréticas (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995). Esta planta tem, no entanto, uma longa história associada a poderes protetores de ‘espíritos malignos’, indicando assim uma atividade no sistema nervoso central (SNC) . O nome *Hypericum* é, de fato, derivado de duas palavras gregas: *hyper* (= sobre, acima) e *eikon* (= ícone, aparição), que – quando postos juntos – justificam o efeito central atribuído a esta planta (AMERICAN HERBAL PHARMACOPEIA - AHP, 1997). A palavra “perforatum” deriva do Latim “perfurado” porque as folhas, quando submetidas à luz, revelam pontos translúcidos

das glândulas de óleo, dando a impressão de que as folhas são perfuradas (BUFALO, 2007).

O uso do *Hypericum* continuou sendo associado com este tipo de problema e foi usado tanto por curandeiros que basearam suas práticas em princípios mais mágicos e talismáticos, quanto por médicos treinados. Assim, já em 1673, o médico Bartolomeus Carrichter dizia que “se a pessoa for possuída por um espírito do mal, deve-se dar a ela folhas da erva-de-São-João” (HOLMES, 1998). John King e Finley Ellingwood, os ‘pais’ americanos do herbalismo médico moderno (como praticado nos países de língua inglesa na atualidade), valorizaram o *Hypericum* por suas propriedades sedativas, antidepressivas, adstringentes e diuréticas (KING, 1866; ELLINGWOOD, 1919).

O nome popular da erva-de-São-João (*St. John's Wort*) tem sido atribuído a plantas em seu ciclo de florescência, que na Europa Central ocorre em torno do dia de São João (24 de Junho), assim como ao pigmento vermelho das flores (uma infusão fria em óleo vegetal gera um óleo vermelho profundo), que foi associado ao sangue de São João Batista (AHP, 1997).

Aspectos botânicos

O *Hypericum perforatum* L. (Fig. 1), da família Clusiaceae (sinonímia Hypericaceae e Guttiferae), é uma planta herbácea perene nativa em toda Europa e Ásia (exceto nas regiões Árticas) e agora está adaptada em muitas outras áreas onde foi introduzido, incluindo a América do Norte (AHP, 1997). O gênero *Hypericum* é representado por 89 espécies, das quais 43 são endêmicas e a espécie mais abundante e mais conhecida é a *Hypericum perforatum* L. (ÇIRAC et al., 2006), com tamanho médio de 60 cm. As folhas apresentam pontos transparentes ou glândulas oleosas que secretam óleo formando uma camada incolor sobre as folhas. As flores são amarelo-alaranjadas brilhantes. O cálice e a corola são marcados com pontos pretos; as sépalas e as pétalas são em número de cinco e as pétalas são salpicadas com pontos pretos (BILIA et al., 2002).

No Brasil algumas espécies encontradas, principalmente na região Sul, são *Hypericum brasiliensis*, *Hypericum myrianthum* e *Hypericum caprifoliatum*, a qual

também apresenta atividade antidepressiva (DAUDT et al., 2000).



Figura 1. *Hypericum perforatum* L.

Fonte: acessado em 02/01/2009 - http://www.ubcbotanicalgarden.org/potd/2007/06/hypericum_perforatum.php

Aspectos químicos

Análises fitoquímicas das partes aéreas revelam a presença de uma grande variedade de substâncias com atividades biológicas diversas (RODRIGUEZ-LANDA e CONTRERAS, 2003). Greeson e colaboradores (2001) relacionaram como principais constituintes as seguintes substâncias:

- Naftodiantronas: hipericina e pseudohipericina (flores e brotos);
- Floroglucínóis: hiperforina e adhiperforina (flores e brotos);
- Flavonóides: quercetina (folhas), hiperosídeo (talo), quercitrina, isoquercitrina, rutina, campferol, mirecetina, amentoflavona, 13,118-biapigenina (brotos);
- Procianidinas: procianidina, catequina, polímeros, epicatequinas (flores e brotos);
- Tanina: ácido tanínico;
- Aminoácidos: GABA, cisteína, glutamina, leucina, lisina, ortinina, prolina, treonina;
- Óleos essenciais: terpenos e álcool;
- Fenilpropanos: ácido cafeíco, ácido clorogênico;
- Xantonas;
- Outras substâncias: ácidos orgânicos, peptídeos, polissacarídeos.

Naftodiantronas

A hipericina (I) e a pseudo-hipericina (II) (Fig. 2) constituem as principais naftodiantronas de interesse farmacológico presentes no *Hypericum perforatum* (ERDELMEIER, 1998), com as concentrações de pseudo-hipericina 2-4 vezes mais altas que da própria hipericina (AHP, 1997; BRANTNER et al., 1994). Brantner e colaboradores (1994) mostraram que as concentrações de hipericina e pseudo-hipericina variam entre 0,03 e 0,3%, dependendo do estágio do desenvolvimento da planta. Contudo, foi sugerido em outros estudos, que as flores secas podem render até 1,8% de hipericina (AHP, 1997). No material fresco também estão presentes os precursores biossintéticos dos constituintes químicos mencionados acima; ou seja, a proto-hipericina e a proto-pseudo-hipericina. Também foi citada a presença de um produto de oxidação de pseudo-hipericina, a ciclo-pseudo-hipericina (KARTING et al., 1996; ESCOP, 1996). Outras naftodiantronas presentes incluem a iso-hipericina e a emodina-antrona. Sendo a hipericina o constituinte que historicamente recebeu a maior atenção e que se acreditava ser o principal constituinte ativo, os diversos produtos comerciais de *Hypericum* costumam estar padronizados de acordo com as concentrações deste composto, geralmente na faixa de 0,03 ou, menos freqüentemente, de 0,02%.

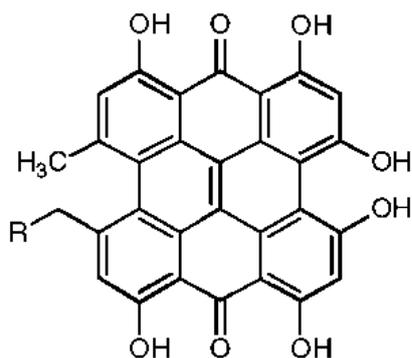


Figura 2. Estrutura química da hipericina e da pseudo-hipericina.

R = H hipericina
R = OH pseudo-hipericina

Fonte: WHO, 2004

Floroglucínóis

Este grupo de substâncias consiste predominantemente do acilfloroglucinol hiperforina (2,0 – 4,5%; Fig.3) e da adhiperforina (0,2 – 1,9%) (BRONDZ et al., 1982; BYSTROV, 1975; MAISENBACHER e KOVAR, 1992). Também foram encontrados análogos oxidados da hiperforina como, por exemplo, a furohiperforina (TRIFUNOVIC et al., 1998) e a oxepahiperforina (VEROTTA et al., 2000), cujas atividades biológicas ainda são desconhecidas. A hiperforina, quantitativamente o principal constituinte no *Hypericum*, é, evidentemente, a substância que recebeu mais atenção nos estudos farmacológicos durante os últimos anos (BEERHUES, 2006), e hoje, muitas vezes, é considerado o constituinte mais importante para a atividade antidepressiva (CHATTERJEE et al., 1998; MÜLLER, 2003).

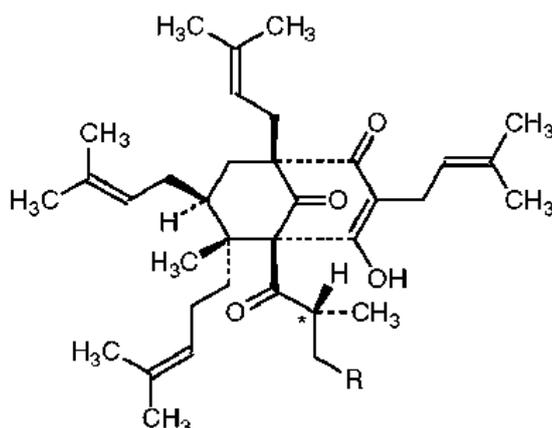


Figura 3. Estrutura química da hiperforina e da adhiperforina

R = H hiperforina

R = CH₃ adhiperforina

Fonte: WHO, 2004

Flavonóides e derivados

Estão presentes no *H. perforatum* quantidades significativas de flavonóides (11% nas flores e 7% nas folhas dos metabólitos secundários – KARTING et al., 1989), cujo envolvimento potencial na atividade antidepressiva tem sido citado (BUTTERWECK et al., 2000; NÖLDNER e SCHÖTZ, 2002). Foram identificados no *H. perforatum* os flavonóides quercetina, luteolina, camferol e miricetina. Os principais flavonóides glicosídeos são a quercitrina, a isoquercitrina, o hiperosídeo, e a

rutina (Fig.4), todos derivados da quercetina, cujo teor pode variar entre 2-4% (WAGNER e BLADT, 1994). Quantitativamente, o hiperosídeo e a rutina, seguidos da isoquercitrina e quercitrina têm sido descritos como os de maior concentração (NAHRSTEDT e BUTTERWECK, 1997). Também foram isolados os biflavonóides amentoflavona (13', 118-biapigenina) e 13, 118-biapigenina (derivados da apigenina) que se supõe serem relevantes para a atividade antidepressiva (GUTMANN et al., 2002).

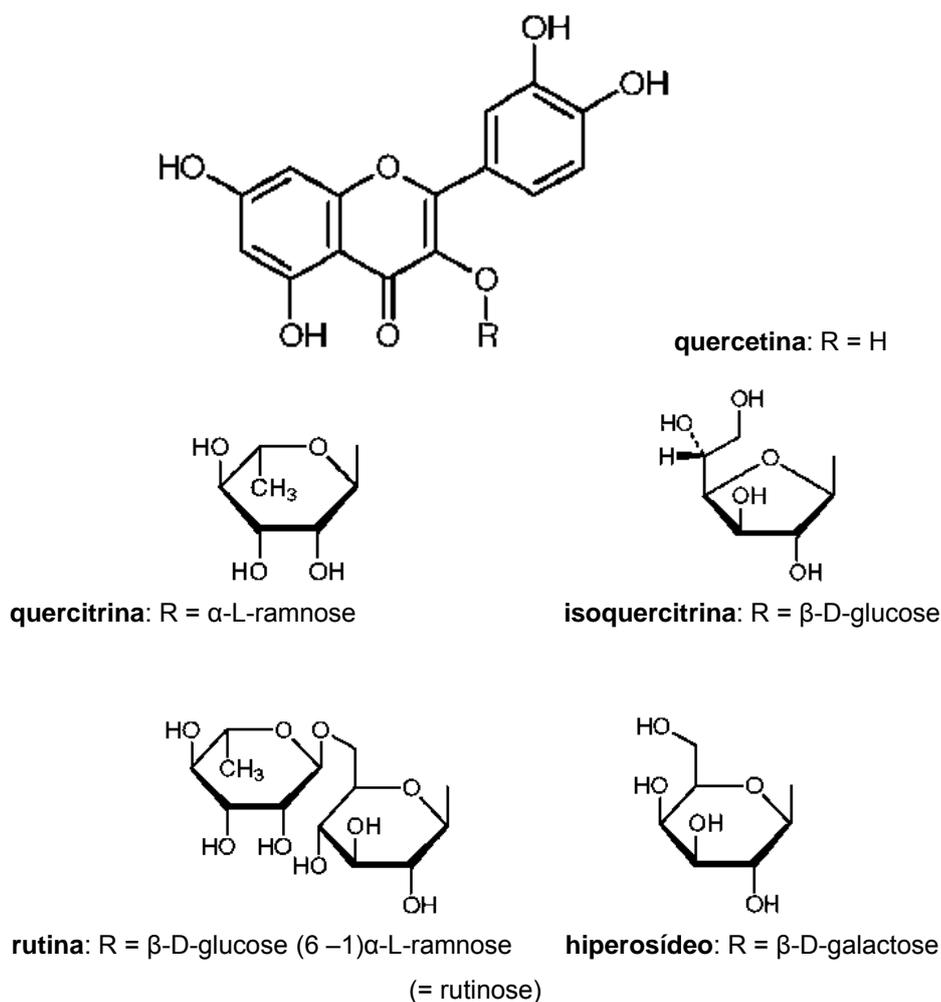


Figura 4. Estrutura química de alguns flavonóides presentes no *H. perforatum* L.
Fonte: WHO, 2004

Substâncias voláteis

Os óleos voláteis de *H. perforatum* (0,059-0,35%) são constituídos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos. Os mais abundantes deles são os hidrocarbonetos saturados alfa-pineno e 2-metil-octano. Também estão presentes traços de 2-metil-decano, 2-metil-butenol e undecano, beta-pineno, alfa-terpineol, geraniol, mirceno, limoneno, cariofileno, humuleno, n-alcanos (C16 – C24), n-alcanóis (C24, C26 e C28) - (AHP, 1997).

Outros Constituintes

Outros constituintes de *H. perforatum* relatados incluem as xantonas (1,3,6,7-tetra-hidroxixantona, mangiferina) (BLADT e WAGNER, 1994), ácidos fenólicos (ácidos clorogênico, neoclorogênico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, isoferúlico, gentísico), taninos condensados (na forma de procianidinas oligoméricas), carotenóides, colina, ácidos graxos, aminoácidos (cisteína, GABA, glutamina, leucina, lisina, ornitina, prolina, teonina), cumarinas (escopoletina, umbeliferona) e vitamina C (AHP, 1997).

Aspectos farmacológicos – estudos pré-clínicos e clínicos

A erva-de-São-João é um fitoterápico utilizado popularmente como antidepressivo, antiinflamatório, colagogo, sedativo, adstringente, diurético suave, antisséptico, cicatrizante, antiirritante, antidiarréico e vermífugo (TESKE e TRENTINI, 2001). Os extratos de *Hypericum perforatum* L. são largamente utilizados para tratamento de depressão (MÜLLER, 2003; BUTTERWECK, 2003). A dose recomendada de *Hypericum perforatum* L., para o tratamento de depressão leve ou moderada, é de 900mg/dia de extrato padronizado de 0,3% hipericina. Altas doses de 1.200 para 1.800 mg/dia têm sido utilizadas para o tratamento de casos de depressão severa (CASS, 2003).

A parte de sua longa história de evidências empíricas, a atividade antidepressiva desta espécie vegetal tem sido observada em muitos estudos pré-clínicos, assim como clínicos (LINDE et al., 1996, 2005; LINDE e MURLOW, 1998; BUTTERWECK, 2003). O *H. perforatum* e seus constituintes isolados têm

consistentemente apresentado atividade nos modelos animais de “desespero comportamental”, a natação forçada (TNF) e a suspensão pela cauda (TSC). Ambos os testes são baseados na premissa de que roedores, quando submetidos a situações inescapáveis, como a suspensão pela cauda e a submersão na água, apresentam comportamentos de fuga e de imobilidade (“desespero comportamental”), que são um reflexo de um estado afetivo de um dado animal. A intervenção farmacológica com drogas antidepressivas, em roedores, promove um aumento no comportamento de fuga, enquanto a administração de depressores favorece uma tendência a aumentar a imobilidade. O principal problema na busca de novas drogas antidepressivas é a questão se o modelo experimental possui critério suficiente de validade analógica para identificar com segurança diversos tratamentos antidepressivos na clínica, sem erros de omissão ou previsão (WILLNER, 1984), uma vez que não é possível induzir distúrbios psiquiátricos em animais, e os modelos animais não podem reproduzir a psicopatologia humana. Entretanto, estes modelos podem ser entendidos como sendo capazes de promover padrões comportamentais que são sensíveis aos agentes terapêuticos de maneira a prever seus efeitos em humanos (THIEBOT et al., 1992). E, de fato, há uma correlação significativa entre a potência clínica e pré-clínica dos antidepressivos em ambos os modelos (PORSOLT, 1981; STÉRU et al., 1985).

Nos estudos pré-clínicos ao longo dos anos, diferentes tipos de extratos de diversas subespécies de *Hypericum* têm mostrado reduzir o parâmetro do tempo de imobilidade em roedores tanto no TNF quanto no TSC (BUTTERWECK et al., 1997, 1998, 2000, 2003a; ÖTZTÜRK, 1997; CHATTERJEE et al., 1998; BHATTACHARYA et al., 1998; DE VRY et al., 1999; PANOCKA et al., 2000; NÖLDNER e SCHÖTZ, 2002; BACH-ROJECKY et al., 2004), com uma eficiência comparável com a dos antidepressivos padrão. Esta atividade antidepressiva específica dos extratos de *Hypericum* foi confirmada pelos resultados obtidos após tratamentos repetidos e pela exclusão de possíveis alterações na atividade locomotora no teste do campo-aberto (WINTERHOFF et al., 1995; BUTTERWECK et al., 2002a, 2003a), excluindo assim a possibilidade da redução de imobilidade ser devida a um efeito estimulante ou a uma atividade anti-histamínica (KITADA et al., 1981; PORSOLT, 1981; SCHLECHTER et.

al., 1979; WALLACH et al., 1979). Vários compostos isolados de *Hypericum* foram também testados na natação forçada. Butterweck e colaboradores (1997, 1998) demonstraram que a hipericina e a pseudo-hipericina isoladas não reduziram a imobilidade no TNF após tratamento único, nas doses comparáveis àquelas presentes no extrato total. No entanto, quando uma fração de procianidinas (previamente separada do extrato total), que *per se* foi inativa, foi combinada com a hipericina, houve uma redução significativa no tempo de imobilidade. Estes resultados sugerem que a hipericina isolada, que apresenta baixa hidrossolubilidade, pode necessitar a presença de certos solubilizantes (ao menos quando administrada em certas doses), para alcançar uma biodisponibilidade adequada. Entretanto, o tratamento repetido por 14 dias com hipericina resultou em uma atividade antidepressiva, mesmo sem a presença do solubilizante (BUTTERWECK et al., 2001b). Estes mesmos pesquisadores também mostraram uma atividade antidepressiva específica para diferentes frações de flavonóides (BUTTERWECK et al., 1997, 2003a), assim como para vários flavonóides isolados (hipersídeo, isoquercitrina e miquelianina) no TNF após dose única e tratamento repetido (BUTTERWECK et al., 2000). Nöldner e Schötz (2002) sugerem que uma concentração maior (“above threshold”) de rutina é necessária para que os extratos de *Hypericum* exerçam atividade antidepressiva no TNF. Mesmo não testando a hiperforina pura, Chatterjee e colaboradores (1998) mostraram uma redução dose-dependente no tempo de imobilidade de ratos no TNF para este composto e seus derivados. Num estudo posterior, a equipe de Butterweck demonstrou uma atividade antidepressiva para a hiperforina isolada (8 mg/kg) no TNF e no TSC, assim como para extratos sem hiperforina (BUTTERWECK et al., 2003a).

Um grande número de ensaios clínicos foi conduzido nos últimos 25 anos mostrando a efetividade da terapia antidepressiva com o *Hypericum*. Em 1996, Linde e colaboradores publicaram uma meta-análise, revendo e analisando dados disponíveis desde 1995, consistindo de 23 estudos (excluindo 14 estudos por serem inadequados em vários aspectos, inclusive a metodologia usada). A maioria destes estudos iniciais, geralmente os de menor escala, verificaram os efeitos antidepressivos das preparações de *Hypericum* em comparação com

antidepressivos convencionais (LINDE et al., 1996); resultados que foram confirmados em revisões subsequentes (VOLZ, 1997, LINDE e MURLOW, 1998; JOSEY e TACKET, 1999; GASTER e HOLROYD, 2000; WILLIAMS et al., 2000). Porém, estudos mais amplos foram publicados entre 2000 e 2002 (MONTGOMERY et al., 2000; SHELTON et al., 2001; HYPERICUM DEPRESSION TRIAL STUDY GROUP, 2002), mostrando, em contraste, resultados negativos. Uma revisão mais recente de Linde e colaboradores (2005) levando estes resultados em consideração, assim como outros ensaios clínicos relevantes (publicados ou não publicados) que foram conduzidos até maio de 2004, analisando 37 ensaios duplo-cego randomizados (26 comparações com placebo e 14 comparações com antidepressivos padrão), excluindo 31 ensaios considerados inadequados em algum aspecto. Afunilando os critérios de inclusão nesta meta-análise, estes autores direcionaram melhor e mais especificamente a questão das preparações de *Hypericum* serem menos efetivas em pacientes com depressão maior que em pacientes com outros sintomas depressivos. Eles concluíram que os extratos de *Hypericum* melhoraram os sintomas depressivos mais que o placebo e de modo similar aos antidepressivos padrão em adultos com depressão leve à moderada, enquanto ensaios restritos a pacientes com depressão maior ou severa de longa duração apresentaram apenas benefícios mínimos após o tratamento com *Hypericum*, quando comparados ao grupo placebo.

Importância médica e comercial do *H. perforatum* – Justificativas do estudo

As preparações de *Hypericum* preparadas com o terço superior das partes aéreas da planta em florescência constituem alguns dos medicamentos mais prescritos na Alemanha, onde competem com sucesso com os SSRIs como os antidepressivos mais prescritos para a depressão leve e moderada. Em 2003, mais de 100 milhões de doses diárias foram prescritas somente na Alemanha (PAFFRATH e SCHWABE, 2004) e o número de prescrições triplicou desde 1993 (BUTTERWECK, 2003). Nos Estados Unidos, a ESJ é um dos medicamentos mais vendidos sem prescrição médica, cujo volume de vendas foi de aproximadamente USD \$ 24 milhões em 2001 (CAPASSO et al., 2003).

O *Hypericum* tem sido muito pesquisado na última década e há uma imensa quantidade de dados disponíveis na literatura científica. É uma das plantas medicinais mais usadas em todos os tempos, rivalizando apenas com o *Ginkgo biloba* e o *Allium sativum*, e não há competição quando se trata do número de estudos clínicos já feitos. Apesar do grande volume de estudos, há ainda muitas questões não respondidas a respeito da farmacologia da planta e seu mecanismo de ação. Duas equipes de especialistas no *front* da pesquisa com o *Hypericum* parecem discordar das conclusões da maior parte dos dados existentes. Enquanto Müller e colaboradores têm enfatizado o papel central da hiperforina na atividade antidepressiva do *Hypericum*, sem negar, entretanto, que outros compostos ativos podem contribuir para esta atividade (MÜLLER, 2003), a equipe de Butterweck e Nahrstedt não entende o papel da hiperforina da mesma maneira e, na verdade, aponta que a atividade antidepressiva dos extratos de ESJ pode ser atribuída à hiperforina, hipericina/pseudohipericina e vários flavonóides, e que o papel e mecanismos destes compostos são ainda motivo de muito debate (BUTTERWECK, 2003). Este autor sugere que múltiplos compostos bioativos contribuem para a atividade do extrato da planta de modo complexo.

A importância terapêutica e econômica/comercial do *Hypericum* leva a uma preocupação em garantir um padrão de qualidade confiável para os fitomedicamentos derivados desta planta. Entretanto, a complexidade dos constituintes do *Hypericum*, assim como de suas propriedades medicinais, dá um bom exemplo das dificuldades práticas encontradas na tentativa de definir a qualidade através de métodos quantitativos. Assim, no Brasil e no mundo, há um grande consumo de *Hypericum perforatum* L., principalmente, para o tratamento de transtornos depressivos.

O mercado farmacêutico brasileiro tem, pelo menos, oito produtos fitoterápicos com extratos de *Hypericum perforatum*. Entretanto, não existem trabalhos que relacionam os constituintes destes produtos fitoterápicos contendo *Hypericum perforatum* L. e sua atribuída atividade antidepressiva. Além disso, Alexandre e colaboradores (2004) observaram, num levantamento dos oito sites das indústrias nacionais produtoras de hipérico, que a maioria disponibiliza informações

sem restrição de acesso aos usuários, sendo que aquelas sobre indicações terapêuticas e interações medicamentosas incompletas e/ou insuficientes. Este levantamento avaliou a qualidade das informações disponibilizadas pelas mesmas indústrias, comparando-as com a literatura científica atualizada. Em resumo, muitas das informações disponibilizadas pelas indústrias farmacêuticas, que produzem medicamentos fitoterápicos à base desta planta, não encontram respaldo na literatura científica.

Desta forma, o presente trabalho procurou estudar quatro destes produtos nos testes validados da natação forçada e da suspensão pela cauda em camundongos, buscando uma correlação de sua atividade com alguns dos constituintes presentes nestas preparações.

Análise Fitoquímica - A eletroforese capilar (EC)

A EC tem demonstrado seu grande potencial no âmbito da análise de alimentos e farmacêuticos. É uma poderosa ferramenta analítica de separação e quantificação, que oferece alto poder de resolução, curto período de análise, fácil preparação da amostra, baixo custo operacional, grande versatilidade e flexibilidade, baixo gasto de solvente e que utiliza quantidades mínimas de amostras (DONG, 1999; WATANABE e TERABE, 2000), em comparação com o HPLC ou a eletroforese convencional em gel (XU, 1995). É, na verdade, uma técnica independente, confiável e extremamente versátil (TAGLIARO, 1998).

A eletroforese capilar de zona (CZE, "capillary zone electrophoresis") ou em solução livre (FSCE, 'free solution capillary electrophoresis') baseia-se no fenômeno de migração diferenciada de uma molécula com carga elétrica não nula num solvente e sob ação de um campo elétrico aplicado. Cada soluto migra à velocidade distinta de outro, devido à mobilidade eletroforética, específica para cada tipo de molécula. A velocidade é proporcional ao campo elétrico e depende principalmente da carga média das moléculas, do seu volume hidrodinâmico e da viscosidade do meio. Na EC, uma amostra, geralmente contendo espécies carregadas, é introduzida no interior de uma das extremidades do capilar, o qual é preenchido com uma solução tampão (ou eletrólito). Sob a influência de um campo elétrico, os analitos

migram do local da injeção no capilar em direção à extremidade do detector, onde serão detectados (KIST et al., 1992; WESTON e BROWN, 1997).

O equipamento é composto de uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida com diâmetro interno de 15 a 100 μm e comprimento entre 30 e 150 cm), eletrodos (os de platina são os mais usados) e um detector - como ilustrado na Figura 5 (TAVARES, 1996; HELLER, 2007). A fonte serve para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar e pode funcionar à voltagem constante (0 - 30 kV) e/ou corrente constante (0 - 200 μA) (TAVARES, 1996; chemkeys).

Quanto mais alta a voltagem de separação, menor é o tempo de migração. A voltagem excessiva deve ser evitada, porque pode causar aquecimento, redução do número de pratos teóricos e diminuição da resolução. Voltagem de separação muito baixa aumentará o tempo de análise consideravelmente, o que torna o pico alargado (PENG et al., 2004).

Nos equipamentos disponíveis comercialmente, os capilares são mantidos dentro de um dispositivo, denominado cartucho, que facilita a introdução no aparelho. O controle de temperatura do capilar é muito importante para assegurar a reprodutibilidade das separações. O controle é feito geralmente por ar ou líquido refrigerador, que passa através do cartucho onde se encontra o capilar (TAVARES, 1996; chemkeys).

O tubo capilar é preenchido com uma solução tampão, também chamada de eletrólito de corrida, e suas extremidades são mergulhadas em recipientes contendo a mesma solução, nas quais é aplicado um campo elétrico, que gera uma corrente no interior do capilar. Os eletrodos também são mergulhados na solução para fechar o circuito.

Existem dois modos de injeção das soluções na EC: hidrodinâmica e eletrocínética. Na primeira, usa-se pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução nos extremos do capilar e esta forma de injeção não é seletiva, sendo que o conteúdo injetado tem a mesma composição da amostra, enquanto que a segunda é induzida pela aplicação de um potencial e é seletiva, sendo que o que é injetado depende da mobilidade e do sinal da carga (TAGLIARO, 1998).

O capilar passa através de um detector, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis, que pode ser utilizado na detecção de muitos tipos de substâncias. A maioria dos equipamentos também possui detectores com arranjo de diodos disponíveis, o qual fornece um espectro de UV/Vis para cada substância detectada (HELLER, 2007).

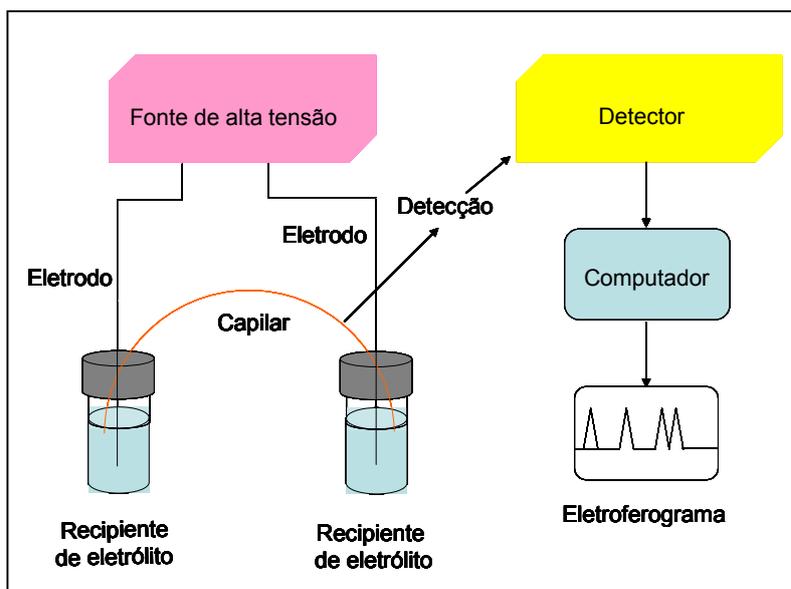


Figura 5. Esquema do instrumento de eletroforese capilar

Na eletroforese capilar há duas contribuições principais para o movimento dos íons: primeiro, a mobilidade/migração eletroforética própria do íon e, segundo, a velocidade e direção do fluxo eletrosmótico (EOF). A eletro-osmose, que se origina na parede do capilar, pode ser induzida a migrar na mesma direção dos íons analitos ou em direção oposta, ou pode ser suprimido, tornando-o negligenciável. A própria superfície do capilar de sílica expõe os grupos silanol os quais, ionizados a SiO^- a pHs maiores que 2, interagem eletrostaticamente com os cátions do tampão, atraídos (alguns firme e outros frouxamente) pelas cargas das paredes do capilar. A aplicação de um alto potencial causa a perda destas ligações dos cátions, que migram ao cátodo, o qual está geralmente na direção do detector, e esta migração arrasta a água osmoticamente na mesma direção, criando um considerável fluxo de líquido, o EOF (TAGLIARO, 1998).

A velocidade eletro-osmótica, que é muito maior em módulo do que a velocidade eletroforética para a maioria das moléculas, faz com que as zonas, separadas entre si, passem pela região de detecção, obtendo-se assim um eletroferograma. A abcissa (eixo x) contém o tempo necessário para um grupo de moléculas de mesma natureza (pico) migrar de uma extremidade até o ponto de detecção que se situa próximo a outra extremidade da coluna. A ordenada (eixo y) é um sinal proporcional ao número de moléculas presentes em um campo, geralmente minúsculo, da coluna (KIST, 1993).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a atividade antidepressiva de quatro produtos fitoterápicos a base de Hipérico disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro nos testes validados em camundongos, buscando correlacionar esta atividade com os níveis de hiperforina e outros constituintes destas preparações.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento oral de camundongos com os quatro produtos fitoterápicos, nos testes da natação forçada e suspensão pela cauda;
- Verificar a atividade motora dos animais tratados, para descartar uma possível interferência da mesma com os testes que avaliam a atividade antidepressiva;
- Investigar os constituintes presentes nas preparações dos produtos estudados, para correlacioná-los com a atividade farmacológica observada.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Testes Farmacológicos

Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (peso 35-45 g, com cerca de 90 dias), fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12h (ligadas às 7:00h e desligadas às 19:00h), com água e ração à vontade. A comida e a água foram retiradas e os animais separados 1h antes do início dos experimentos.

As observações experimentais foram realizadas entre 12:00h e 16:00h. Os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo de N°. PP00030/CEUA e 23080.08007244/006-70/CEUA/UFSC (09/07/2006). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

Drogas e reagentes

Os extratos de *Hypericum perforatum* denominados A, C e D foram comprados em Dezembro de 2006 em Farmácias na proximidade da Universidade Federal de Santa Catarina. O extrato B foi doado por um laboratório farmacêutico conhecido.

A hiperforina foi gentilmente doada por Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals (Karlsruhe, Alemanha). A quercetina, isoquercitrina e rutina foram isoladas no Laboratório de Química Orgânica - Departamento de Química, da UFSC.

O cloridrato de imipramina (Sigma) foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

As bulas dos medicamentos fitoterápicos indicam a seguinte composição farmacêutica para os extratos:

Extrato A: cada comprimido contém 250mg de extrato seco ZE117* de *Hypericum perforatum* L. O extrato seco de Remotiv está padronizado em 0,20% de hipericina total (equivalente a 0,75mg de hipericina). Excipientes: celulose microcristalina, lactose, macrogol, estearato de magnésio, polietilenoglicol e opadry OY-22963 (composto por hidroxipropilmetilcelulose, dióxido de titânio, macrogol e óxido de ferro).

* Extrato ZE 117 - Este processo é patenteado (solvente de extração: etanol 50% peso/peso; medicamento - extrato razão: 4-7:1) e garante um produto consistente com um conteúdo de hiperforina muito baixo (< 0,1% hiperforina (Kientsch et al, 2001)).

Extrato B: Não tem bula. Contém 300mg de *Hypericum perforatum* padronizado com 0,30% hipericina total (equivalente a 0,90mg de hipericina).

Extrato C: cada comprimido revestido contém extrato seco de *Hypericum perforatum* L - 300mg. Cada comprimido contém 0,3% de hipericina total (equivalente a 0,90mg de hipericina). Excipientes: cellactose, amido glicolato de sódio, estearato de magnésio, dióxido de silício, polimetacrilato, talco, trietil citrato, polissorbatato, polietilenoglicol, simeticone, corante I. a. amarelo, dióxido de titânio.

Extrato D: comprimidos revestidos de 450mg - cada comprimido revestido contém extrato seco de *Hypericum perforatum* L. a 0,3% de hipericina - 450mg (equivalente a 1,35mg de hipericina). Excipientes: celulose microcristalina, lactose, croscamelose sódica, estearato de magnésio, talco magnesita, acetona, álcool isopropílico, polietilenoglicol 6000, dióxido de titânio, corante, copolímero ácido metacrílico, água de osmose.

Preparação dos extratos e solução controle

Os extratos A, C, e D foram pulverizados num almofariz. O extrato B já chegou sob forma de uma suspensão densa, dentro de cápsulas gelatinosas moles. Em seguida, os extratos foram misturados com água de torneira e agitados em Vortex® por 2 min produzindo suspensões homogêneas. Foram preparadas suspensões de cada extrato em 4 concentrações: 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo (água de torneira).

As doses utilizadas do extrato de *Hypericum perforatum* foram determinadas de acordo com a dose terapêutica em humanos de 4,28 – 17,86 mg/kg/dia (300 – 1250 mg/dia), corrigidas para a superfície corporal (cálculo alométrico; CASS, 2003), e levando em consideração as doses mais altas geralmente usadas nos ensaios farmacológicos, como descritos na literatura (BUTTERWECK et al., 1997, 2003).

A imipramina, um antidepressivo tricíclico padrão, foi utilizada como controle positivo. Foi preparada uma solução de cloridrato de imipramina em água, agitada por 2 min, na concentração de 3,0 mg/mL.

Todas as preparações (extratos e controles) foram administradas por via oral por gavagem (cânula intragástrica, Fig. 6) no volume de 0,1 mL/10g de peso corporal dos animais.



Figura 6. Técnica de administração intragástrica (gavagem) em camundongos.

Testes Comportamentais

Teste da suspensão pela cauda (TSC)

O teste da suspensão pela cauda foi realizado conforme descrito por Stéru e colaboradores (1985). Este teste baseia-se na observação que camundongos quando suspenso pela cauda, sem possibilidade de fuga, adotam um comportamento característico no qual ocorre um período de alta atividade inicial, seguido de períodos de imobilidade, sendo esta imobilidade relacionada a um estado de desistência (*behavioral despair*), semelhante à síndrome depressiva humana. Medicamentos antidepressivos diminuem este tempo de imobilidade e muitas vezes aumentam a latência até a imobilidade ocorrer, constituindo este método um procedimento adequado de 'screening' para novos medicamentos antidepressivos (Stéru et al., 1985).

Os animais foram presos com uma fita adesiva pelo terço final da cauda, a 50 cm do chão, e distante por, pelo menos, 50 cm de qualquer objeto (Fig.7). O animal permaneceu nesta condição durante 5 min, nos quais foram registrados o tempo até a primeira imobilidade (latência) e o tempo total em que o animal permaneceu imóvel (imobilidade).



Figura 7. Teste da suspensão pela cauda.

Teste de natação forçada (TNF)

O teste do nado forçado foi desenvolvido por Porsolt e colaboradores, em 1977, para auxiliar na pesquisa de medicamentos antidepressivos. O objetivo foi criar um teste animal que reproduzisse um comportamento semelhante à depressão e que fosse sensível a medicamentos utilizados clinicamente no tratamento desta patologia. O teste foi baseado na observação de que ratos e camundongos quando forçados a nadar numa situação em que não poderiam escapar, após um curto período de agitação, adotam uma postura de imobilidade, flutuando ou fazendo apenas movimentos necessários para manter a sua cabeça acima da água. O tempo de imobilidade neste modelo avalia o “desespero comportamental” que reflete um estado de “depressão”, sensível ao tratamento com antidepressivos como a imipramina e desipramina (PORSOLT, 1981; PORSOLT et al., 1977a, 1977b, 1978).

Os camundongos foram forçados a nadar individualmente, em um cilindro plástico aberto de 12,5 cm de diâmetro e 18,5 cm de altura, contendo 13,5 cm de água (1600 mL) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 8). Foi marcado o tempo de imobilidade e a latência (tempo até a primeira imobilidade) durante 5 min consecutivos à colocação dos animais na água, sendo os animais considerados imóveis quando permaneciam parados, realizando unicamente os movimentos necessários para manterem-se flutuando na superfície da água.



Figura 8. Teste da natação forçada.

Teste do campo aberto (CA)

Com a finalidade de excluir a possibilidade de que um eventual efeito antidepressivo, isto é, uma diminuição do tempo de imobilidade no TSC ou no TNF seja devido a um aumento na atividade locomotora (como descrito por Porsolt et al., 1981, para anfetamina e cafeína), os camundongos foram submetidos a uma sessão no teste do campo aberto, como descrito por Kulkarni e Daniya (1973). O teste foi realizado em uma arena de acrílico transparente medindo 30 x 30 x 15 cm, com chão preto dividido em 9 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com todas as patas por sessão foi o parâmetro principal usado para avaliar a atividade locomotora. Foi registrado o número de quadrados percorridos num tempo de 5 min, assim como o número de levantamentos (o animal se apoiando nas patas posteriores). O comportamento de cada animal foi avaliado sob iluminação de luz vermelha (15 W), e a arena foi limpa com uma solução de etanol 10% entre os testes.

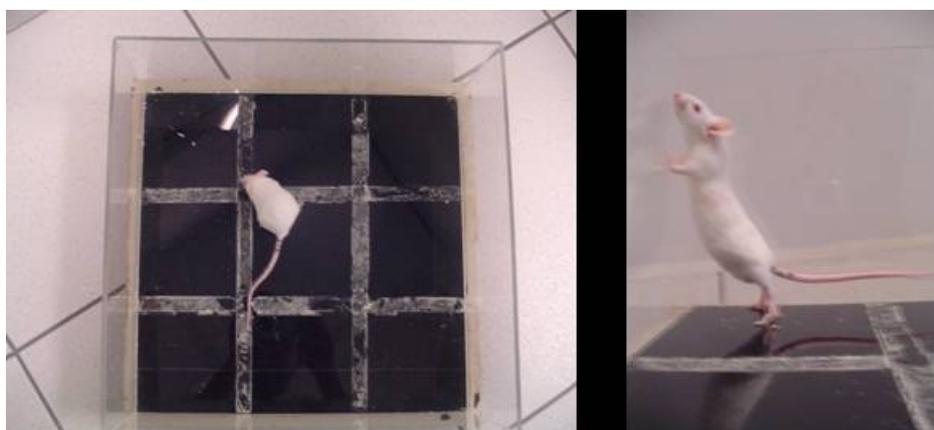


Figura 9. Teste do campo-aberto.

Protocolos experimentais

O tratamento agudo consistiu em uma administração única dos extratos (na concentração de 62,5, 125, 250 ou 500 mg/kg), controle (veículo) ou controle positivo (imipramina 30 mg/kg) 90 min antes de submeter os animais numa seqüência de testes consistindo de:

- 1) Teste de campo aberto (por 5 min)
- 2) Teste da suspensão pela cauda (por 5 min)

No teste de natação forçada os grupos experimentais receberam 3 administrações na concentração de 500mg/kg nos intervalos de 24, 5 e uma hora antes do teste, este protocolo assim representando um tratamento subagudo, como proposto por Porsolt e colaboradores (1977a). Os grupos controle e controle positivo receberam 3 administrações de veículo (água de torneira) ou imipramina (30 mg/kg) respectivamente, da mesma forma como descrito acima. Um número mínimo (n) de 7 animais foi utilizado para cada grupo testado.

Como usamos fêmeas em todos os estudos, foi avaliado o ciclo estral destes animais depois dos testes, como descrito na literatura (HOAR, 1975). Todos os animais que estavam na fase de estro ou entre proestro e estro foram excluídos dos resultados, com uma porcentagem de exclusão de 16,6%. Animais no metaestro ou proestro, ou entre metaestro e diestro, ou diestro e proestro, foram incluídos na análise dos resultados, sendo que seus parâmetros comportamentais não mostraram diferenças significativas em comparação com os animais no diestro (80% dos animais testados).

Todos os animais que agarraram a cauda mais que duas vezes ou que caíram durante a suspensão foram retirados da análise dos resultados.

Análise estatística

Para a análise estatística e os gráficos ilustrativos foi usado o *software* Prism GraphPad versão 4.0. Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, conforme o protocolo experimental, seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado. O grupo controle positivo (imipramina) foi analisado através do teste-*t* de Student bi-caudal não pareado em comparação com o grupo controle (veículo). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando *p* foi menor ou igual a 0,05.

Análise Fitoquímica

Preparação de amostras e padrões

Inicialmente, vários solventes / misturas (metanol absoluto, etanol absoluto, metanol/água 80:20, etanol/água 50:50) compatíveis com a técnica utilizada, foram estudados para determinar o solvente mais adequado para obter a melhor extração de constituintes e separação de picos. Os melhores resultados foram obtidos com etanol absoluto.

A preparação de todos os padrões e amostras foi realizada na hora dos ensaios analíticos, partindo de uma solução-estoque. Foram preparadas diluições seriais para os padrões (rutina e isoquercitrina: 99,00 mg/L, 49,50 mg/L, 24,75 mg/L, 12,38 mg/L, 6,19 mg/L; hiperforina e quercetina: 100,00 mg/L, 50,00 mg/L, 25,00 mg/L, 12,50 mg/L, 6,25 mg/L) em etanol absoluto, que foram injetados diretamente no equipamento de eletroforese para construir a curva de calibração.

Os extratos A, C, e D foram pulverizados. O extrato B já chegou em forma de uma suspensão densa, dentro de cápsulas gelatinosas moles. Uma quantidade determinada das amostras (A=199,9 mg; B=433,4 mg; C=199,1 mg; D=201,4 mg) foi dissolvida em 10 mL de etanol absoluto. As soluções foram sonicadas por 1:30 h e centrifugadas por 10 min a 6200 rpm.

200 µL do sobrenadante foram injetados diretamente no equipamento de eletroforese, sem nenhuma diluição prévia.

Foi feito um único ensaio para cada diluição dos padrões e duplicata para cada amostra. Todos os testes foram realizados por Melina Heller, MSc, no laboratório da Química Analítica (Departamento de Química) da Universidade Federal de Santa Catarina em Novembro de 2008, sob a supervisão do Prof. Dr. Gustavo Micke.

Equipamento

As análises foram realizadas em um equipamento de eletroforese capilar, modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologie, (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com um detector com arranjo de diodos. Foi utilizado um capilar de externo de poli-imida

(48,5 cm x 50 μm D.I. x 375 μm D. E.), da Polymicro (Phoenix, AZ, USA) e a temperatura do capilar foi mantida em 25°C. O programa para aquisição e tratamento dos dados utilizado foi HP Chemstation®.

Condições Experimentais

- Eletrólito composto por 20 mmolL^{-1} tetraborato de sódio (TBS) em água e acetonitrila (30%), pH= 9,30
- Injeção hidrodinâmica 50 mbar por 5 s
- Tensão aplicada 25 kV polaridade positiva
- Capilar de sílica fundida com revestimento externo de poli-imida (48,5 cm x 50 μm D.I. x 375 μm D. E.), da Polymicro (Phoenix, AZ, USA)
- Temperatura do capilar = 25 °C
- Absorção (UV) máxima: flavonóides = 390 nm; hiperforina = 300 nm

RESULTADOS

RESULTADOS

Avaliação farmacológica

Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)

Tempo de Imobilidade

A imipramina, um antidepressivo tricíclico, utilizada como controle positivo, administrada na dose de 30mg/kg reduziu o tempo de imobilidade de maneira significativa ($t(32) = 7,157$; $p < 0,001$), como esperado, em comparação com o grupo controle (veículo), como ilustrado na figura 10.

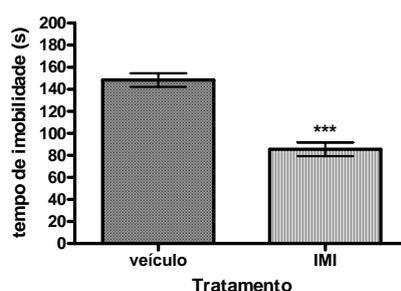
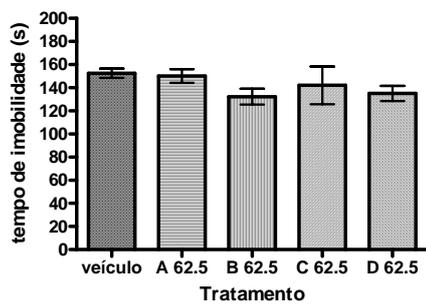
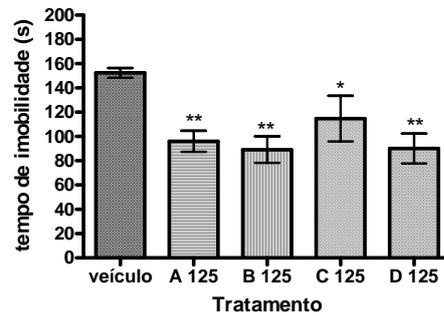


Figura 10. Efeito da administração oral de imipramina na dose de 30mg/kg ($n = 18$), em comparação com o veículo (grupo controle, $n = 16$) no tempo de imobilidade (em segundos) de camundongos avaliados no teste da suspensão pela cauda. Os dados são expressos como a média \pm EPM (***) $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle - veículo).

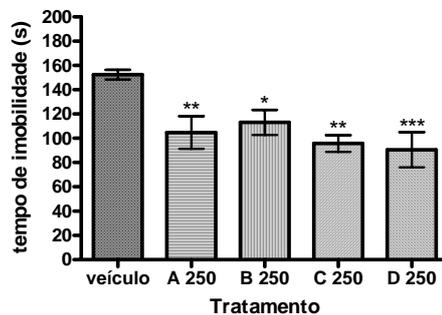
Como pode ser observado na figura 11 (I), na dose de 62,5 mg/kg, nenhum dos extratos testados mostrou diferença estatisticamente significativa no tempo de imobilidade, que indicasse uma atividade do tipo antidepressiva para qualquer deles, como analisado na ANOVA de uma via, em comparação com o grupo controle ($F(4,35) = 1.017$; $p = 0,4122$).



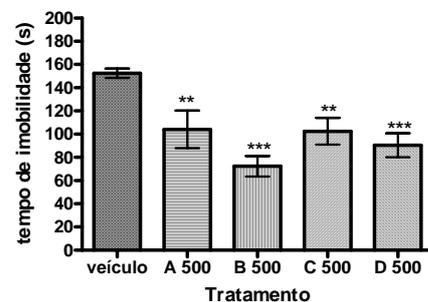
(I) 62,5 mg/kg



(II) 125 mg/kg



(III) 250 mg/kg



(IV) 500 mg/kg

Figura 11. Efeito da administração oral dos extratos A, B, C e D nas doses de 62,5 mg/kg (I), 125 mg/kg (II), 250 mg/kg (III) e 500 mg/kg (IV) sobre o tempo de imobilidade (em segundos) de camundongos, avaliados no teste da suspensão pela cauda em comparação com o grupo tratado com veículo (grupo controle, n = 10). Os dados são expressos como a média \pm EPM. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle - veículo).

62,5 mg/kg (extratos A, B: n = 7; extratos C, D: n = 8)

125 mg/kg (extratos A, B, C, D: n = 7)

250 mg/kg (extratos A, B: n = 8; extrato C: n = 7; extrato D: n = 9)

500 mg/kg (extratos A, C, D: n = 7; extrato B: n = 8)

Contudo, nas doses mais altas (125, 250 e 500 mg/kg) todos os extratos testados diminuíram o tempo de imobilidade de modo estatisticamente significativo ($p < 0,05$), resultado compatível com uma atividade do tipo antidepressiva dos produtos testados.

Na dose de 125 mg/kg (Fig. 11 (II)), a ANOVA de uma via revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F(4,33) = 6,716$; $p = 0,0005$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que os extratos A, B e D diferiram estatisticamente significativo do grupo controle ($p < 0,01$), enquanto a diferença

significativa para o extrato C foi de $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle. Em comparação com o tempo de imobilidade de 152,4s ($\pm 4,009$), observado no grupo controle, os extratos A, B, C e D reduziram a imobilidade para 96,14s ($\pm 8,653$), 89,14s ($\pm 10,93$), 114,7s ($\pm 18,83$) e 90,14s ($\pm 12,32$), respectivamente.

Na dose de 250mg/kg (Fig. 11 (III)), a ANOVA de uma via revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F(4,37) = 6,026$; $p = 0,0008$). Na análise *a posteriori* (teste de Newman-Keuls) o extrato D diferiu estatisticamente do grupo controle com $p < 0,001$, enquanto os extratos A e C diferiram estatisticamente com $p < 0,01$. O extrato B apresenta uma diferença significativa de $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle. Em comparação com o tempo de imobilidade de 152,4s ($\pm 4,009$), observado no grupo controle, os extratos A, B, C e D reduziram a imobilidade para 104,8s ($\pm 13,52$), 113,1s ($\pm 10,37$), 95,71s ($\pm 6,927$) e 90,56s ($\pm 14,48$), respectivamente.

Na dose de 500mg/kg (Fig. 11 (IV)), a ANOVA de uma via revelou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F(4,34) = 10,17$; $p < 0,0001$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que os extratos B e D diferiram estatisticamente do grupo controle com $p < 0,001$, enquanto extratos A e C diferiram estatisticamente com $p < 0,01$. Em comparação com o tempo de imobilidade de 152,4s ($\pm 4,009$), observado no grupo controle, os extratos A, B, C e D reduziram a imobilidade para 104,1s ($\pm 16,15$), 72,38s ($\pm 8,944$), 102,4s ($\pm 11,58$) e 90,43s ($\pm 10,34$), respectivamente.

Latência para Imobilidade

Na dose de 30 mg/kg, a imipramina, como ilustrado na figura 12, aumentou a latência para imobilidade de forma significativa ($t(32) = 2,277$; $p = 0,0296$), em comparação com o grupo controle (veículo).

Houve um aumento estatisticamente significativo na latência para imobilidade apenas para extratos A e C ($p < 0,05$) na dose de 125 mg/kg e para o extrato B na dose de 500 mg/kg ($p < 0,01$), quando comparado com o grupo controle (veículo).

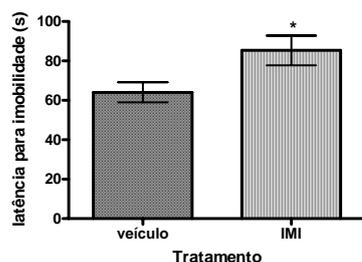
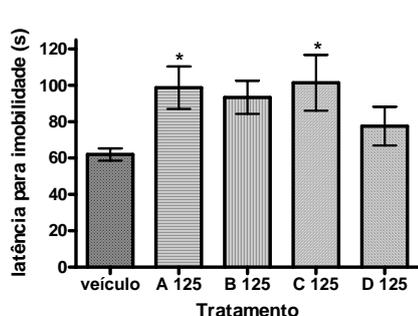
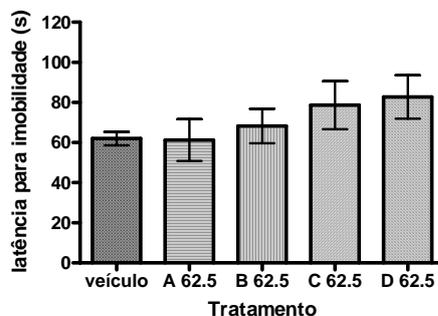


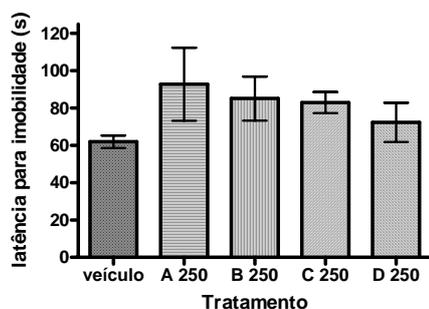
Figura 12. Efeito da administração oral de imipramina 30mg/kg (controle positivo, n = 18) na latência para imobilidade (em segundos) de camundongos avaliados no teste da suspensão pela cauda, em comparação com os animais tratados com veículo (grupo controle, n = 16). Os dados são expressos como a média \pm EPM (* $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle-veículo).



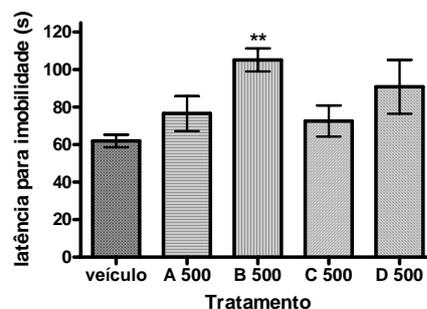
(I) 62,5 mg/kg



(II) 125 mg/kg



(III) 250 mg/kg



(IV) 500 mg/kg

Figura 13. Efeito da administração oral dos extratos A, B, C e D nas doses de 62,5 mg/kg (I), 125 mg/kg (II), 250 mg/kg (III) e 500 mg/kg (IV) sobre a latência para imobilidade (em segundos) de camundongos, avaliados no teste da suspensão pela cauda em comparação com o grupo tratado com veículo (grupo controle, n = 10). Os dados são expressos como a média \pm EPM. (** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle - veículo).

62,5 mg/kg (extratos A, B: n = 7; extratos C, D: n = 8)

125 mg/kg (extratos A, B, C, D: n = 7)

250 mg/kg (extratos A, B: n = 8; extrato C: n = 7; extrato D: n = 9)

500 mg/kg (extratos A, C, D: n = 7; extrato B: n = 8)

Como pode ser observado na figura 13 (I), na concentração de 62,5 mg/kg, nenhum dos extratos testados mostrou diferenças estatísticas na latência para imobilidade, como analisado na ANOVA de uma via, em comparação com o grupo controle ($F(4,35) = 1,161$; $p = 0,3448$).

Na dose de 125 mg/kg (Fig. 13 (II)), a ANOVA de uma via revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F(4,33) = 3,104$; $p = 0,0284$). Na análise *a posteriori* (teste de Newman-Keuls), somente os extratos A e C diferiram estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$). Em comparação com a latência para imobilidade de 62,0s ($\pm 3,393$), observada no grupo controle, os extratos A e C aumentaram a latência para 98,71s ($\pm 11,67$) e 101,4s ($\pm 15,35$), respectivamente, reforçando sua atividade do tipo antidepressiva.

Como pode ser observado na figura 13 (III), na dose de 250 mg/kg, nenhum dos extratos testados mostrou uma diferença estatisticamente significativa na latência para imobilidade, como analisado pela ANOVA de uma via, em comparação com o grupo controle ($F(4,37) = 1,207$; $p = 0,3244$).

Na dose de 500 mg/kg (Fig. 13 (IV)), a ANOVA de uma via revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F(4,34) = 4,442$; $p = 0,0054$). A análise *a posteriori* (teste de Newman-Keuls) mostrou que apenas o extrato B diferiu estatisticamente do grupo controle ($p < 0,01$). Em comparação com a latência para imobilidade de 62,0s ($\pm 3,393$), observada no grupo controle, o extrato B aumentou a latência para 105,1s ($\pm 6,128$).

Teste de Campo Aberto (CA)

No teste de campo aberto, nenhuma das substâncias testadas (imipramina e os extratos A, B, C e D) mostrou diferenças estatísticas nos parâmetros testados (número de cruzamentos e de levantamentos), em comparação com o grupo controle.

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados (média e EPM) para os extratos, o veículo e a imipramina nos parâmetros número de cruzamentos e número de

levantamentos no teste de campo aberto, respectivamente. O teste-*t* de Student revelou que a imipramina não diferiu do grupo veículo, com $t(32) = 0,5779$; $p=0,5674$ e $t(32) = 0,9044$; $p=0,3725$, respectivamente, para os parâmetros número de cruzamentos e número de levantamentos.

Tabela 1. Número de cruzamentos no teste de campo aberto.

Veículo	média	61.69			
	EPM	6.667			
Imipramina	média	55.22			
	EPM	8.719			
Extratos		62.5mg/kg	125mg/kg	250mg/kg	500mg/kg
A	média	56.00	55.29	53.13	78.57
	EPM	5.341	3.476	7.042	10.57
B	média	70.14	72.57	56.75	62.88
	EPM	7.236	11.51	5.105	10.98
C	média	60.00	61.29	61.57	48.57
	EPM	10.42	6.704	7.852	6.604
D	média	61.38	74.14	72.22	46.00
	EPM	9.851	8.362	10.76	8.813

Tabela 2. Número de levantamentos no teste de campo aberto.

Veículo	média	29.50			
	EPM	3.710			
Imipramina	Média	24.89			
	EPM	3.497			
Extratos		62.5mg/kg	125mg/kg	250mg/kg	500mg/kg
A	média	20.86	29.57	26.50	32.71
	EPM	3.918	5.126	3.841	5.093
B	média	24.71	30.14	26.88	27.50
	EPM	4.994	4.464	2.807	2.666
C	média	28.63	25.86	28.86	21.57
	EPM	6.748	3.011	2.807	4.434
D	média	26.88	29.86	30.22	27.00
	EPM	5.387	3.240	4.027	5.952

Para os extratos avaliados nos parâmetros número de cruzamentos e número de levantamentos, a ANOVA de uma via revelou os seguintes resultados:

- Cruzamentos: 62,5 mg/kg - ($F(4,35) = 0,4152$; $p = 0,7965$); 125 mg/kg - ($F(4,33) = 1,291$; $p = 0,2938$); 250 mg/kg - ($F(4,37) = 1,023$; $p = 0,4082$); 500 mg/kg - ($F(4,34) = 2,339$; $p = 0,0749$).

- Levantamentos: 62,5 mg/kg - ($F(4,35) = 0,4950$; $p = 0,7394$); 125 mg/kg - ($F(4,33) = 0,2093$; $p = 0,9315$); 250 mg/kg - ($F(4,37) = 0,2330$; $p = 0,9180$); 500 mg/kg - ($F(4,34) = 0,8936$; $p = 0,4784$).

Teste da Natação Forçada (TNF)

No teste de natação forçada, o antidepressivo padrão (imipramina), administrado três vezes em um período de 24h na dose de 30 mg/kg (24h, 5h e 1 h antes do teste), reduziu o tempo de imobilidade de forma significativa ($t(15) = 4,556$; $p = 0,0004$), em comparação com o grupo controle (Fig. 14 (I)). A imipramina também aumentou a latência para imobilidade ($t(15) = 3,129$; $p = 0,0069$), como ilustrado na figura 14 (II).

Os extratos A, B, C e D, administrados três vezes na dose de 500 mg/kg (24h, 5h e 1 h antes do teste) também reduziram o tempo de imobilidade de quando comparados com o grupo controle (Fig. 14 (I)). A ANOVA de uma via revelou que diferença estatística entre os grupos ($F(4,42) = 3,486$; $p = 0,0151$). O teste *post hoc* (Newman-Keuls) mostrou que todos os grupos experimentais diferiram estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$). A diminuição no tempo de imobilidade ocorreu na magnitude de 136,7s ($\pm 16,53$) para o extrato A, 127,1s ($\pm 11,52$) para o extrato B, 137,7s ($\pm 11,23$) para o extrato C e 141,6s ($\pm 6,194$) para o extrato D, quando comparados com o valor de 181,7s ($\pm 5,667$) observado no grupo controle. Entretanto, nenhum dos extratos aumentou significativamente a latência para imobilidade, em comparação com o grupo controle, como refletido no resultado da ANOVA de uma via ($F(4,42) = 1,008$; $p = 0,4145$) e ilustrado na figura 14 (II).

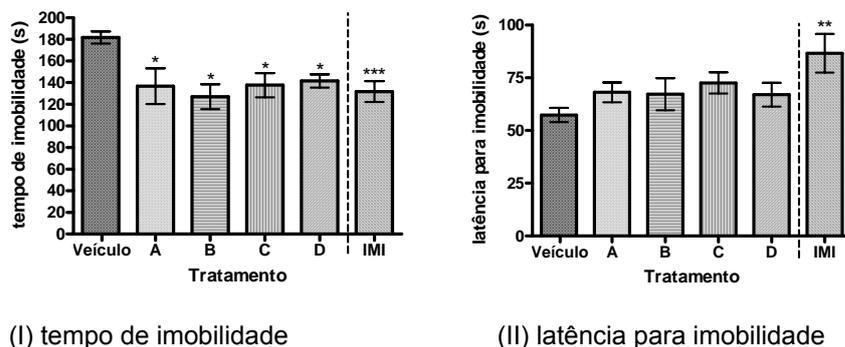


Figura 14. Efeito da administração oral dos extratos A, B, C e D na dose de 500 mg/kg (n = 10, 9, 9, 10, respectivamente) ou imipramina 30 mg/kg (controle positivo, n = 8) no **tempo de imobilidade** (I) e na **latência para imobilidade** (II) - em segundos - de camundongos avaliados no teste de natação forçada, em comparação com o grupo tratado com veículo (controle, n = 9). Os dados são expressos como a média \pm EPM (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle - veículo).

Resultados Químicos

Curvas de Calibração

A figura 15 mostra o eletroferograma com os picos das soluções dos padrões rutina (A), isoquercitrina (B), quercetina (C) e hiperforina (D) nas concentrações mais altas injetadas de 99 mg/L (para A e B) e 100 mg/L (para C e D), respectivamente.

Os tempos de migração (em 390nm) foram 5,7 min para a rutina; 6,4 min para a isoquercitrina e 9,3 min para a quercetina, e (em 300nm) 3,9 min para a hiperforina.

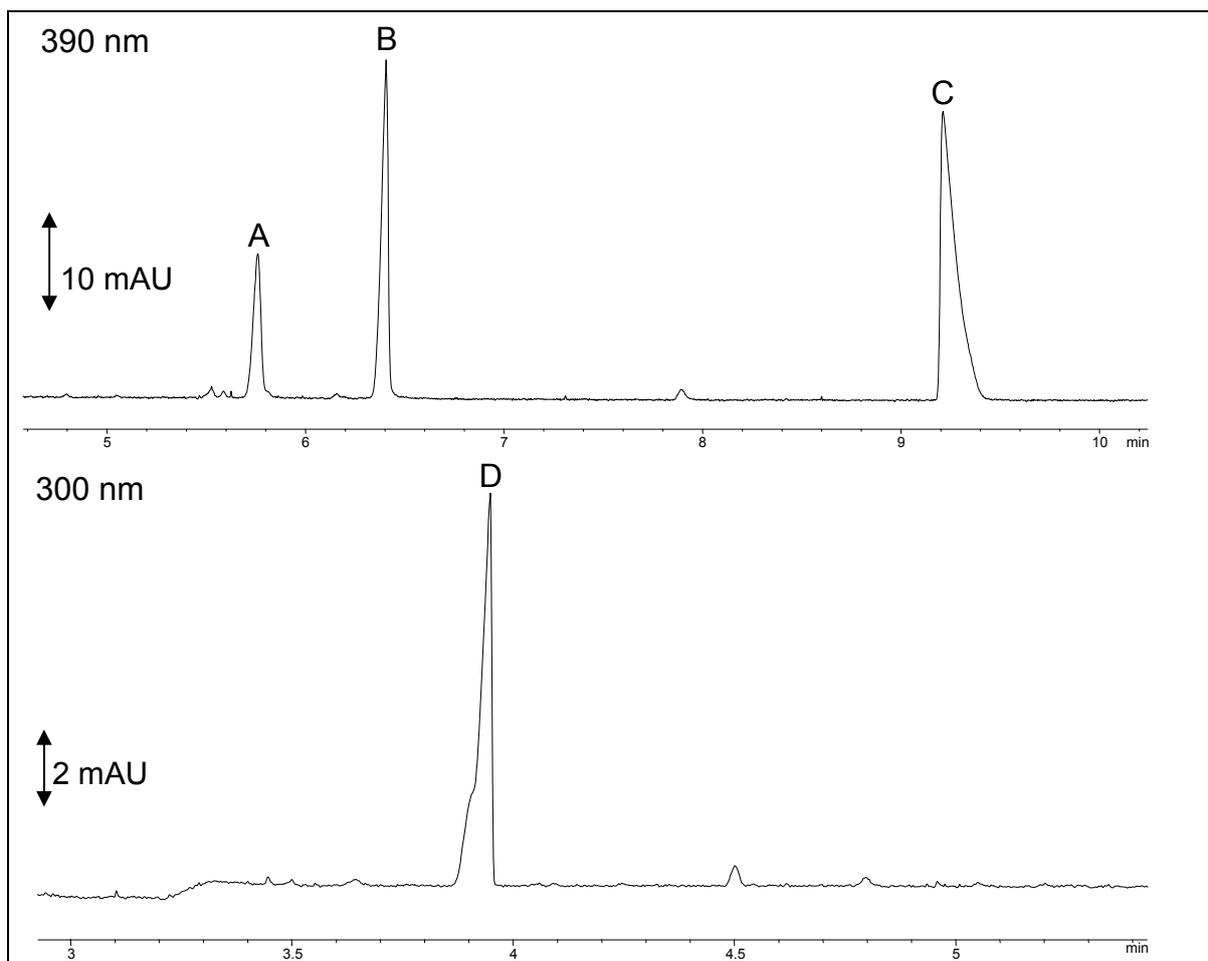
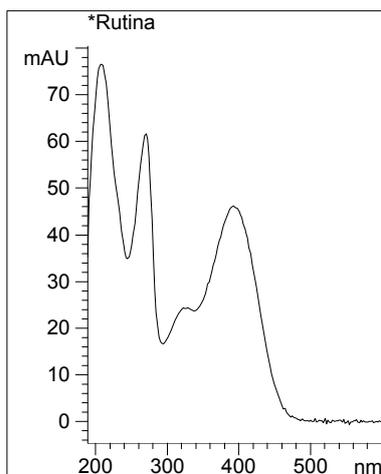
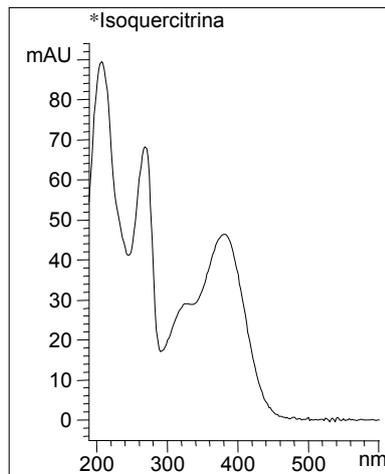


Figura 15. Eletroferograma dos padrões rutina (A = 99 mg/L), isoquercitrina (B = 99 mg/L), quercetina (C = 100 mg/L) e hiperforina (D = 100 mg/L); mAU = miliunidade de absorvência.

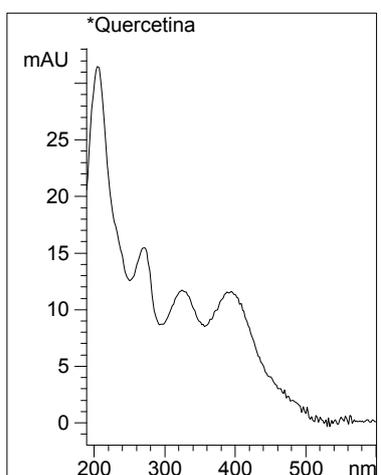
Os espectros de UV para estas substâncias estão ilustrados na Figura 16. A Tabela 3 soma as medidas das áreas de picos obtidas para as varias diluições, assim formando a base das curvas de calibração (Figura 17).



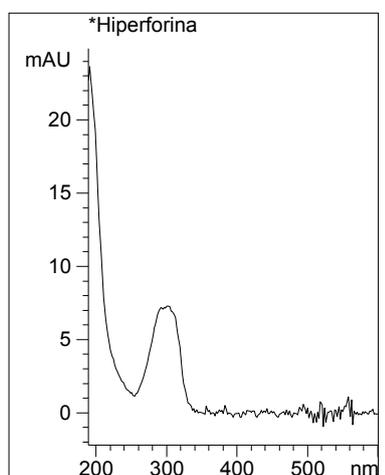
(I) Espectro de UV de rutina



(II) Espectro de UV de isoquercitrina



(III) Espectro de UV de quercetina



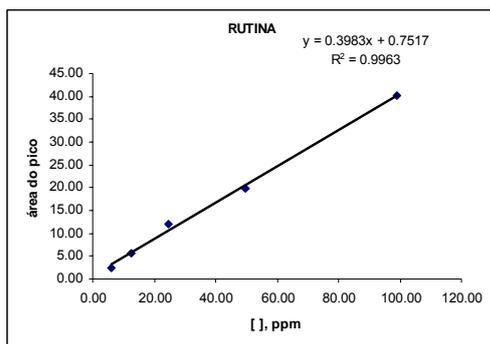
(IV) Espectro de UV de hiperforina

Figura 16. Espectros de UV dos padrões de rutina, isoquercitrina, quercetina e hiperforina.

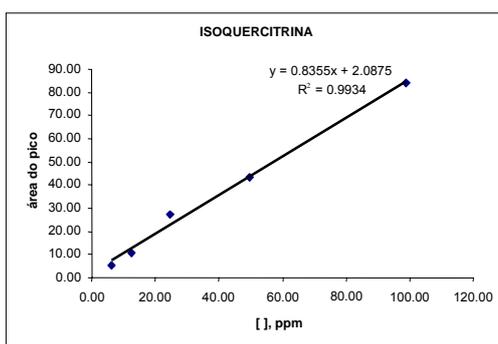
Tabela 3. Concentrações dos padrões injetados em ppm (= mg/L) e áreas de picos correspondentes.

ponto	[, ppm				ÁREAS			
	R	I	Q	H	R	I	Q	H
P1	99.00	99.00	100.00	100.00	40.20	84.10	150.00	22.70
P2	49.50	49.50	50.00	50.00	19.80	43.30	74.50	12.50
P3	24.75	24.75	25.00	25.00	12.10	27.20	34.60	6.70
P4	12.38	12.38	12.50	12.50	5.66	10.70	10.70	3.10
P5	6.19	6.19	6.25	6.25	2.40	5.40	7.90	1.10

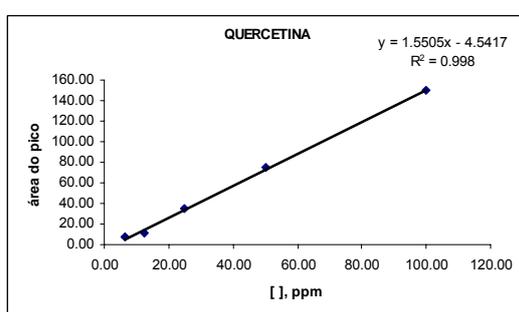
R = rutina, I = isoquercitrina, Q = quercetina, H = hiperforina



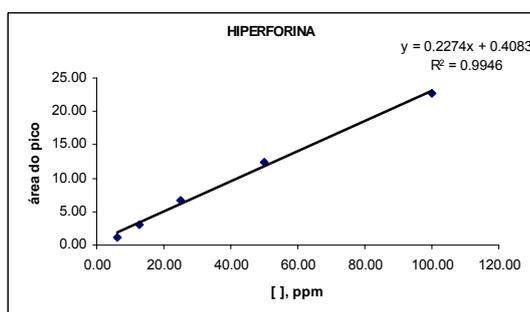
(I) Curva de calibração de rutina



(II) Curva de calibração de isoquercitrina



(III) Curva de calibração de quercetina



(IV) Curva de calibração de hiperforina

Figura 17. Curvas de calibração para os padrões de rutina, isoquercitrina, quercetina e hiperforina.

A partir das curvas de calibração para os padrões (Figura 17 I-IV), obtiveram-se as seguintes equações da reta:

$$y = 0,3983x + 0,7517 \text{ (rutina)}$$

$$y = 0,8355x + 2,0875 \text{ (isoquercitrina),}$$

$$y = 1,5505x - 4,5417 \text{ (quercetina) e}$$

$$y = 0,2274x + 0,4083 \text{ (hiperforina),}$$

nas quais **X** representa a concentração (ppm) do padrão e **Y** corresponde à área do pico. Os coeficientes de correlação (R^2) das curvas de calibração foram 0,9963 para rutina, 0,9934 para isoquercitrina, 0,9980 para quercetina e 0,9946 para hiperforina. Houve boa correlação linear entre o pico e a quantidade dos padrões usados nas faixas de 6,19 a 99 ppm para rutina e isoquercitrina e 6,25 a 100 ppm para

quercetina e hiperforina, respectivamente. A Tabela 4 apresenta os valores das equações de reta e os coeficientes de correlação para os padrões, assim como os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). O LOD foi calculado usando o método baseado em parâmetros da curva analítica e expresso como: $LD = 3,3 \times (s/S)$, onde s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica. Como o LOD, o LOQ é expresso como uma concentração e foi calculado como: $LQ = 10 \times (s/S)$.

Tabela 4. Dados das curvas de calibração.

	a	b	R ²	LOD*	LOQ*
RUTINA	0.3983	0.7517	0.9963	5.38	17.92
ISOQUERCITRINA	0.8355	2.0875	0.9934	7.24	24.13
QUERCETINA	1.5505	4.5417	0.998	3.96	13.20
HIPERFORINA	0.2274	0.4083	0.9946	6.61	22.05

a = inclinação da curva de calibração (= sensibilidade); b = interseção com o eixo y (quando x = 0); R² = Coeficiente da Correlação; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação (* em mg/L).

Eletoferogramas dos extratos

As Figuras 18 a 21 mostram os eletroferogramas das análises dos quatro extratos testados.

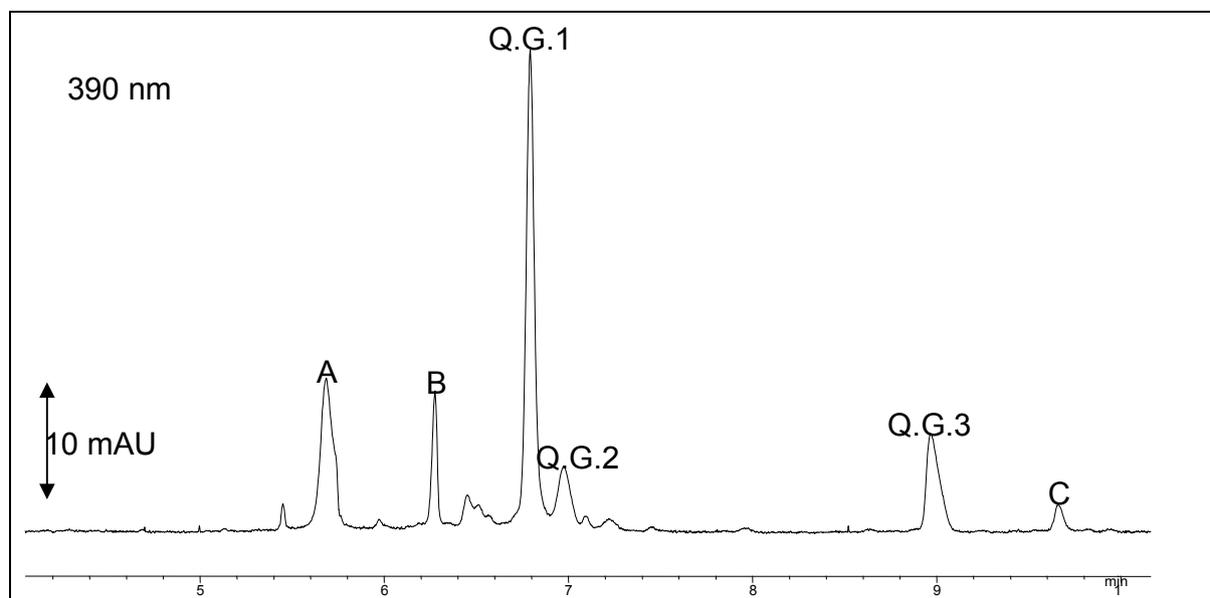


Figura 18. Eletoferograma do extrato A.

A = rutina; B = isoquercitrina; Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3; C = quercetina

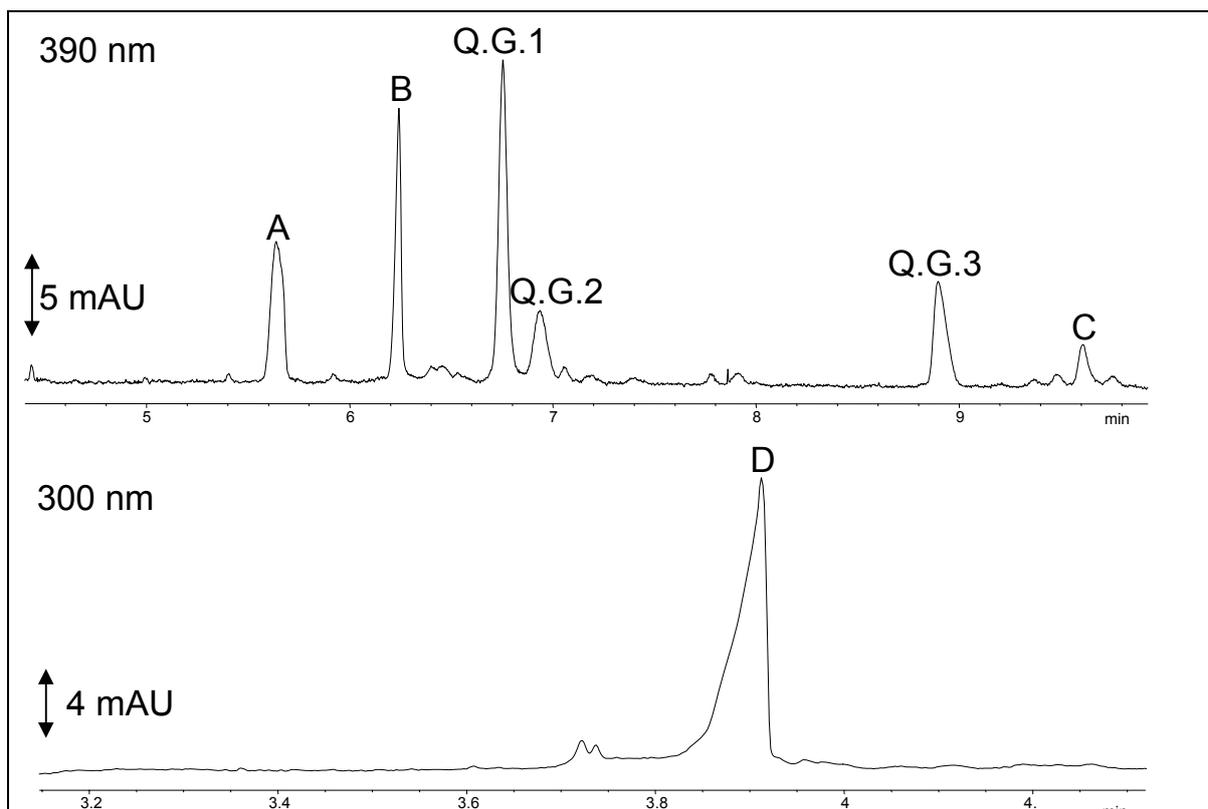


Figura 19. Eletroferograma do extrato B.

A = rutina; B = isoquercitrina; Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3; C = quercetina; D = hiperforina

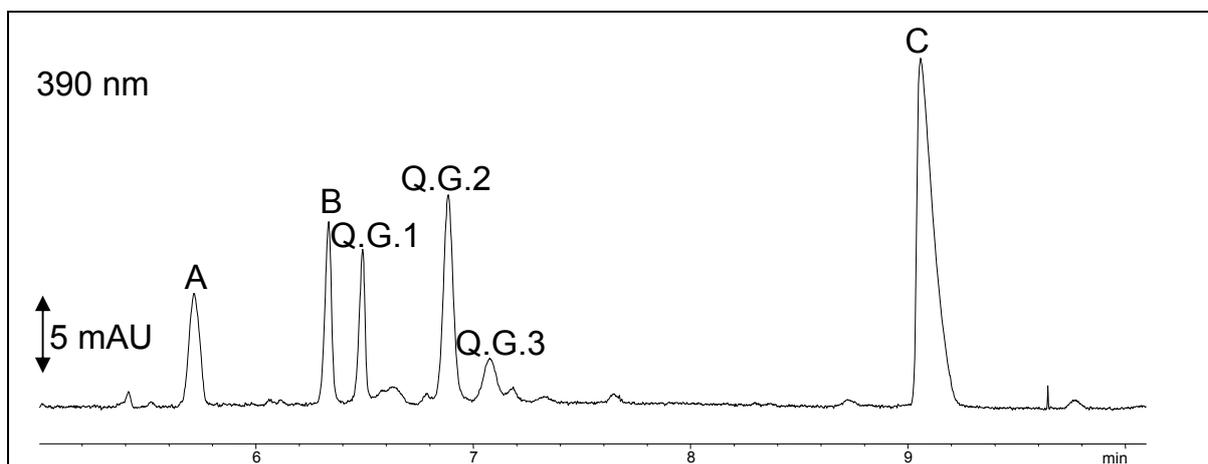


Figura 20. Eletroferograma do extrato C.

A = rutina; B = isoquercitrina; Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3; C = quercetina

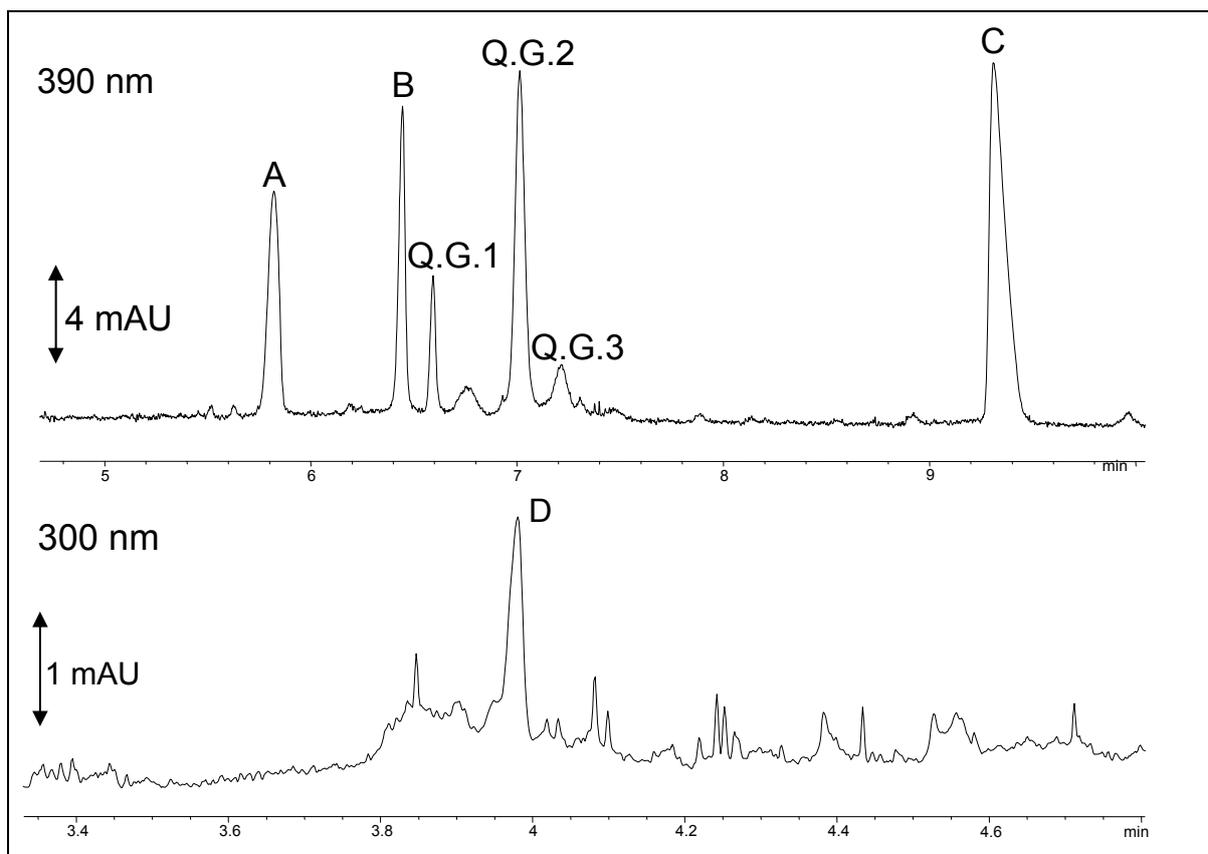


Figura 21. Eletroferograma do extrato D.

A = rutina; B = isoquercitrina; Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3; C = quercetina; D = hiperforina

Foram realizadas análises da média e desvio padrão (dos picos medidos) de dois ensaios, como apresentadas na Tabela 5. Aplicados nos gráficos de dispersão linear (curvas de calibração) e suas respectivas equações da reta, obtiveram-se as concentrações dos flavonóides / hiperforina nas amostras injetadas (em mg/L), como apresentado na Tabela 6.

Tabela 5. Área dos picos dos flavonóides / hiperforina

		RUTINA	ISOQUERC.	Q. G. 1	Q. G. 2	Q. G. 3	QUERCET.	HIPERFOR.
Extrato A	ÁREA 1	65.20	24.10	132.40	20.40	42.70	6.90	0.00
	ÁREA 2	59.29	22.03	134.30	23.56	37.42	7.17	0.00
	MÉDIA	62.25	23.07	133.35	21.98	40.06	7.04	0.00
	DP	4.18	1.46	1.34	2.23	3.73	0.19	0.00
Extrato B	ÁREA 1	37.10	35.40	61.90	18.20	27.70	7.90	35.00
	ÁREA 2	32.66	31.98	54.35	15.68	25.14	7.08	32.60
	MÉDIA	34.88	33.69	58.13	16.94	26.42	7.49	33.80
	DP	3.14	2.42	5.34	1.78	1.81	0.58	1.70
Extrato C	ÁREA 1	23.80	24.70	18.10	42.50	9.70	120.80	0.00
	ÁREA 2	19.12	22.82	16.64	28.50	8.02	107.77	0.00
	MÉDIA	21.46	23.76	17.37	35.50	8.86	114.29	0.00
	DP	3.31	1.33	1.03	9.90	1.19	9.21	0.00
Extrato D	ÁREA 1	33.30	27.20	10.20	45.10	6.10	78.60	3.06
	ÁREA 2	30.30	24.96	9.38	41.56	6.25	71.53	2.70
	MÉDIA	31.80	26.08	9.79	43.33	6.18	75.07	2.88
	DP	2.12	1.58	0.58	2.50	0.11	5.00	0.25

Área 1 = primeiro ensaio 1; Área 2 = segundo ensaio; Média = média dos dois ensaios; DP = desvio padrão; Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3

Tabela 6. Concentração dos flavonóides / hiperforina nas amostras injetadas em mg/L

	Rutina	Isoquer.	Q. G. 1	Q. G. 2	Q. G. 3	Quercetina	Hiperforina
Extrato A	154.39	25.11	332.91	53.30	98.69	7.47	<LOD
Extrato B	85.68	37.82	144.05	40.64	64.44	7.76	146.84
Extrato C	51.99	25.94	41.72	87.24	20.36	76.64	<LOD
Extrato D	77.95	28.72	22.69	106.90	13.62	51.34	10.87)

Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3
LOD = limite de detecção

Para chegar à percentagem de flavonóides e hiperforina na massa do produto farmacêutico usado no preparo das amostras (Tabela 7) foi realizado o seguinte cálculo:

Concentração dos flavonóides e hiperforina nas amostras injetadas em mg/L dividido por 100 = Concentração dos flavonóides / hiperforina nas amostras injetadas em mg/10mL.

Concentração dos flavonóides / hiperforina nas amostras injetadas em 10mL, dividida por quantidade das amostras (A= 199,9 mg; B= 433,4 mg; C= 199,1 mg; D= 201,4 mg) dissolvida em 10 mL de etanol absoluto e multiplicado por 100 = porcentagem de flavonóides e hiperforina na massa do produto farmacêutico usada no preparo das amostras (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de flavonóides / hiperforina na massa do produto farmacêutico usada no preparo das amostras.

	Rutina	Isoquer.	Q. G. 1	Q. G. 2	Q. G. 3	Quercetina	Flavonóides tot.	Hiperforina
Extrato A	0.77	0.13	1.67	0.27	0.49	0.04	3.36	<LOD
Extrato B	0.20	0.09	0.33	0.09	0.15	0.02	0.88	0.34
Extrato C	0.26	0.13	0.21	0.44	0.10	0.38	1.53	<LOD
Extrato D	0.39	0.14	0.11	0.53	0.07	0.25	1.50	0.05

Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3
LOD = limite de detecção

Para chegar à porcentagem dos flavonóides e hiperforina na massa do extrato de Hipérico (Tabela 8), aplicou-se o seguinte cálculo:

Extrato A: peso comprimido 572mg -> conteúdo *Hypericum perforatum* 250mg = 43,70% -> % de flavonóide / hiperforina na massa de produto farmacêutico dividido por 0,437 = % de flavonóide / hiperforina na massa do extrato de Hipérico.

Extrato B: peso do líquido na cápsula 673mg -> conteúdo *Hypericum perforatum* 300mg = 44,58% -> % de flavonóide / hiperforina na massa de produto farmacêutico dividido por 0,4458 = % de flavonóide / hiperforina na massa do extrato de Hipérico.

Extrato C: peso comprimido 869mg -> conteúdo *Hypericum perforatum* 300mg = 34,50% -> % de flavonóide / hiperforina na massa de produto farmacêutico dividido por 0,3450 = % de flavonóide / hiperforina na massa do extrato de Hipérico.

Extrato D: peso comprimido 1025mg -> conteúdo *Hypericum perforatum* 450mg = 43,90% -> % de flavonóide / hiperforina na massa de produto farmacêutico dividido por 0,439 = % de flavonóide / hiperforina na massa do extrato de Hipérico.

Tabela 8. Porcentagem de flavonóides / hiperforina na massa do extrato de *Hypericum*

	Rutina	Isoquer.	Q. G. 1	Q. G. 2	Q. G. 3	Quercetina	Flavonóides tot.	Hiperforina
Extrato A	1.76	0.30	3.82	0.62	1.12	0.09	7.69	<LOD
Extrato B	0.49	0.20	0.74	0.20	0.34	0.04	1.97	0.76
Extrato C	0.75	0.38	0.61	1.28	0.29	1.10	4.34	<LOD
Extrato D	0.88	0.32	0.25	1.21	0.16	0.57	3.42	0.11

Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3
LOD = limite de detecção

Foram medidas as seguintes concentrações de constituintes nas amostras: rutina entre 0,49% e 1,76%; isoquercitrina entre 0,20 % e 0,38%; quercetina entre 0,04 e 1,10%; flavonóides totais entre 1,97 e 7,69% e hiperforina entre não detectável e 0,76%.

A partir destes valores também pôde ser determinada a massa (em mg) de flavonóides e hiperforina por unidade de aplicação (comprimido / cápsula), como apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Massa de flavonóides / hiperforina em mg por comprimido / cápsula.

	Rutina	Isoquer.	Q. G. 1	Q. G. 2	Q. G. 3	Quercetina	Flavonóid. tot.	Hiperforina
Extrato A	4.40	0.75	9.55	1.55	2.80	0.23	19.28	<LOD
Extrato B	1.47	0.60	2.22	0.60	1.02	0.12	6.03	2.28
Extrato C	2.25	1.14	1.83	3.84	0.87	3.30	13.23	<LOD
Extrato D	3.96	1.44	1.13	5.43	0.72	2.57	15.25	0.50

Q.G.1 = quercetina glicosilada 1; Q.G.2 = quercetina glicosilada 2; Q.G.3 = quercetina glicosilada 3
LOD = limite de detecção

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a atividade farmacológica de quatro preparações comerciais de *H. perforatum*, disponíveis no mercado brasileiro, em dois testes comportamentais validados, a natação forçada e a suspensão pela cauda. Além disso, analisamos os extratos quanto à presença de constituintes tais como a hiperforina e os flavonóides rutina, quercetina e isoquercitrina. Para tal usamos um sistema de eletroforese capilar não-aquoso, um método simples e confiável para separação de todos os constituintes citados numa única corrida. O objetivo de combinar os testes farmacológicos com o perfil fitoquímico dos extratos comerciais no mesmo estudo, foi investigar se as possíveis diferenças na atividade dos extratos nos testes comportamentais estariam correlacionadas com variações nos constituintes presentes nos produtos. Este estudo pode também contribuir para melhor elucidar a importância relativa, em termos de atividade antidepressiva, dos constituintes-chave do *H. perforatum*.

Nossos dados dos testes farmacológicos mostraram que os quatro extratos comerciais reduziram significativamente o parâmetro primário de tempo de imobilidade, no teste de suspensão pela cauda, numa faixa de dose de 125 a 500 mg/kg após o tratamento oral agudo. Observamos um aumento na latência para imobilidade para dois extratos na dose de 125 mg/kg e para um extrato na dose de 500 mg/kg; porém não houve nenhum padrão constante de mudança neste parâmetro, nem uma relação dose – resposta.

No TNF, após o tratamento subagudo (500 mg/kg, administrado oralmente 3 vezes em 24h), todos os extratos diminuíram significativamente o tempo de imobilidade, sem modificar a latência. Como esperado, a imipramina, controle positivo da atividade antidepressiva, diminuiu o tempo de imobilidade em ambos os modelos experimentais, assim como aumentou a latência para imobilidade nestes testes.

No teste do campo aberto, nenhuma diferença significativa foi observada em qualquer dos parâmetros registrados (número de cruzamentos e de levantar) para

qualquer grupo experimental, incluindo a imipramina, quando comparados com os valores controle. Assim, com a exclusão da possível interferência da atividade locomotora (efeito estimulante) e com o uso do esquema subagudo de tratamento para excluir uma possível atividade inespecífica e antihistamínica dos extratos (KITADA et al., 1981; BUTTERWECK et al., 2003a), a redução do tempo de imobilidade observada em nosso estudo pode ser assumida como específica e indicativa de uma atividade do tipo antidepressiva (PORSOLT, 1981; SCHLECHTER et al., 1979; WALLACH et al., 1979; WINTERHOFF et al., 1995; BUTTERWECK et al., 2003a).

Em resumo, nossos resultados dos testes comportamentais sugerem uma atividade do tipo antidepressiva significativa para os quatro extratos comerciais de *Hypericum*, sem mostrar qualquer diferença significativa entre os diferentes produtos. Estes resultados são consistentes com a maioria dos estudos usando os mesmos testes comportamentais para avaliar a atividade antidepressiva de extratos de *H. perforatum* como podem ser observados na Tabela 10, que resume os principais estudos e resultados farmacológicos, incluindo os presentes resultados.

Entretanto, dois estudos recentes com extratos comerciais de *H. perforatum* disponíveis no mercado mostraram efeitos menos promissores no TNF. Jean e colaboradores (2006) observaram que dos três extratos testados, somente um reduziu o tempo de imobilidade em camundongo, em comparação com o grupo controle, de forma similar à fluoxetina. Guilhermano e colaboradores (2004) relataram em seu estudo que nenhum dos dois extratos testados, nem a hipericina isolada, reduziu o tempo de imobilidade em ratos, em comparação com os valores controle, enquanto a imipramina, controle positivo para atividade antidepressiva neste estudo, reduziu significativamente o tempo de imobilidade.

A falta de atividade da hipericina isolada no teste da natação forçada pode ser devida ao fato de que este composto somente reduz a imobilidade quando administrado repetidamente (mais de 14 dias), ou na presença de alguns solubilizantes (que estão naturalmente presentes no *H. perforatum*) que contrapõem a baixa hidrossolubilidade da hipericina (BUTTERWECK et al., 1997, 1998, 2001a).

Tabela 10. Resumo de estudos farmacológicos do *H. perforatum* e dos seus constituintes analisados.

Autor, ano	Teste	Espécie animal	Preparação, dosagem e via de aplicação	Atividade antidepressiva*
Öztürk, 1997	TNF	C	extrato etanólico 250mg/kg i.p.	+
Bhattacharya et al., 1998	TNF	C R	E.A. ¹ (50, 150, 300mg/kg/day) x 3days v.o. estr.CO ₂ ² (5, 15, 30mg/kg/day) x 3days v.o.	+ (150, 300mg) + (15, 30mg)
Butterweck et al., 2000	TNF	R	Frações de Hipérico ricas em flavonóides ³ F1 (5mg/kg; 10.05 mg/kg) F2 (3.5 mg/kg) F1a (2.32 mg/kg) F1b (2.71 mg/kg) hiperosídeo (0.3 – 7.61mg/kg) quercitrina (0.6mg/kg) isoquercitrina (0.6mg/kg) astilbina (0.6mg/kg) - miqueliana (0.6mg/kg) quercetina (0.4mg/kg) (todos 3 X: 24, 5, 1h antes do teste)	++ +++ ++ ++ + (0.6-1.3mg/kg) - ++ - +++ -
Nöldner & Schrötz, 2002	TNF	R	M.E. ⁴ (300mg/kg) x 7 dias v.o. E.E. ⁵ (300mg/kg) x 7 dias v.o. rutina (9mg/kg) x 7 dias v.o. M.E. ⁴ + rutina (9mg/kg) x 7 dias v.o.	- ++ - ++
Bejjamini & Andreatini, 2003	TNF	R	extrato seco ⁶ (150, 300, 500mg/kg) 3 X (24, 18, 1h antes do teste)	+ (todas dosagens)
Butterweck et al., 2003	TSC TNF	C R	E.E. ⁷ (500mg/kg) v.o. E.R. 1 ⁸ (500mg/kg) v.o. E.R. 2 ⁹ (500mg/kg) v.o. hiperforina (2, 4, 8, 20mg/kg) v.o. E.E. ⁷ (250, 500mg/kg) 3 X (24, 5, 1h) v.o. E.E. ⁷ (250, 500mg/kg) 14 dias v.o. E.R. 1 ⁸ (250, 500mg/kg) 3 X (24, 5, 1h) v.o. E.R. 1 ⁸ (250, 500mg/kg) 14 dias v.o. E.R. 2 ⁹ (250, 500mg/kg) 3 X (24, 5, 1h) v.o. E.R. 2 ⁹ (250, 500mg/kg) 14 dias v.o.	- + + + (4 e 8 mg/kg) + (500mg/kg) + (500mg/kg) + (500mg/kg) + (500mg/kg) + + (500mg/kg)
Guilhermano et al., 2003	TNF	R	E.E.C. 1 e 2 ¹⁰ (125, 250, 375mg/kg) v.o. hipericina (25, 50, 75 µg/kg) v.o.e i.p. (todos 3 X: 24, 5, 1h antes do teste)	- -
Skalisz et al., 2004	TNF	C	extrato seco ¹¹ (150, 300, 500mg/kg) v.o.	+ (todas dosagens)
Bach-Rojecky et al., 2004	TSC & TNF	C	extrato seco (7, 35, 70mg/kg) i.p.	+ (35mg/kg) ++ (70mg/kg) TSC & TNF
Jean et al., 2006	TNF	C	E.E.C. 1 & 2 ¹⁰ E.S.C. 1 ¹² (todos 250mg/kg) 14 dias v.o.	+ (só E.E.C. 1) -
Petzsch et al., 2009	TNF TSC	C C	E.S.C. 1, 2, 3, 4 ¹² (62,5; 125; 250; 500mg/kg) v.o. E.S.C. 1, 2, 3, 4 ¹² (500mg/kg 3 X (24, 5, 1h) v.o.	Entre + e +++ (125 – 500mg/kg) +

C = camundongo; R = rato; TNF = teste de natação forçada; TSC = teste de suspensão pela cauda; + p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001, - não significativo; v.o. += via oral (gavagem), i.p. = injeção intraperitoneal; * avaliada por diminuição no tempo de imobilidade

¹ Extrato etanólico (4.5% hiperforina); ² Extrato CO₂ (hiperforina 38.8%; sem hipericina; ³ Frações de *Hypericum* ricas em flavonóides: F1(principalmente: hiperosídeo, quercitrina, isoquercitrina e outros não identificados); F2 (principalmente: hipersídeo, quercitrina e outros não identificados); F1a (principalmente: hiperosídeo, quercitrina, isoquercitrina, miqueliana); F1b(concentrações baixas de hiperosídeo e astilbina);⁴ Extrato metanólico 80% (contem rutina 0.8%)

⁵ Extrato etanólico 60% (contem rutina 3.5%);⁶ Extrato seco LI 160 (hipericina 0.3%; hiperforina 3.3%);⁷ Extrato etanólico (hipericina 0.15%; hiperforina 3.2%);⁸ Extrato reduzido 1 (hipericina 0.14%; sem hiperforina); ⁹ Extrato reduzido 2 (flavonóides 12%, sem hipericina / hiperforina); ¹⁰ Extratos etanólicos comerciais; ¹¹ Extrato seco LI 160 (hipericina 0.33%; hiperforina 3.0%); ¹² Extrato seco comercial.

Quanto à falta de atividade dos extratos testados nestes dois estudos, Guilhermano e colaboradores (2004) sugeriram vários fatores que poderiam ser importantes para consideração, tais como o meio ambiente em que a planta cresceu (i.e., condições do solo e climáticas), fatores genéticos intrínsecos ao material vegetal, período da colheita e, provavelmente, o mais importante fator sejam os procedimentos usados na plantação, estocagem, secagem e extração, levando a diferentes produtos farmacêuticos no final. Os autores apontam para a necessidade de testar detalhadamente várias concentrações de outros constituintes que não a hipericina, como fizemos no presente estudo, comparando e contrastando os métodos de extração e a estabilidade dos constituintes ativos quando da distribuição ao consumidor. Os resultados de nosso estudo, como discutidos adiante, vêm de encontro a estas considerações.

A análise fitoquímica procedida no presente estudo levou a resultados interessantes quanto ao perfil químico dos constituintes dos quatro extratos comerciais. Somente o extrato B contém quantidades significativas de hiperforina (0,76%), o constituinte mais frequentemente sugerido como responsável pela atividade antidepressiva do *H. perforatum* (MÜLLER, 2003). A hiperforina é também detectável no produto D, embora numa concentração abaixo do limite de quantificação. Nos produtos A e C esta substância encontra-se abaixo dos níveis detectáveis. No caso do produto A, de fato, a quantidade encontrada está dentro das especificações do fabricante, como especificado no processo de extração patenteado (ZE 117), sendo um produto com conteúdo de hiperforina consistente e garantidamente baixo, isto é, menos que 0,1% (KIENTSCH et al, 2001). Os produtos C, D e, numa menor extensão, B, no entanto, tem muito menos hiperforina que a quantidade estipulada de 2 - 4,5%, quantidade esta sugerida como valor de referência para os conteúdos de hiperforina para extratos derivados de *H. perforatum* (BYSTROV, 1975; MAISENBACHER e KOVAR, 1992; AHP, 1997). Um aspecto que deve ser destacado refere-se à alegada instabilidade da hiperforina (ORTH et al., 1999; BILIA et al., 2001; GANZERA et al., 2002), que pode ter

contribuído para os resultados observados no presente estudo e que será discutida melhor mais adiante.

O extrato B, além de conter o maior conteúdo de hiperforina entre os produtos testados, também apresenta a menor concentração de quercetina e vários de seus derivados glicosilados (1,97%), em comparação com todos os outros extratos. O intencionalmente baixo conteúdo de hiperforina no extrato A, no outro lado do espectro, é compensado pela maior concentração de flavonóides (7,69%) entre os extratos testados. O que é interessante observar neste contexto é que, apesar dos perfis químicos completamente diferentes, ao menos no que diz respeito à hiperforina e aos flavonóides, ambos os extratos (assim como os extratos C e D, com seus perfis químicos intermediários) apresentaram atividade do tipo antidepressiva de magnitude similar nos testes farmacológicos.

Podemos, assim, assumir com cautela, que se outros fatores forem constantes entre os diferentes extratos (tais como o conteúdo de hipericina), tanto a hiperforina quanto os derivados de quercetina, possuem atividade do tipo antidepressiva independente e de igual magnitude.

Analisar os conteúdos de hipericina seria importante para o perfil químico dos produtos aqui estudados, mas, infelizmente, não tínhamos o padrão de hipericina quando da análise. A hipericina é aceita amplamente pela indústria como um marcador para padronizar os produtos comerciais de *H. perforatum*, por muitas razões históricas. A hipericina é, de fato, o único constituinte explicitamente quantificado nas especificações farmacêuticas dos quatro produtos testados. No entanto, como alguns estudos indicam, a precisão das concentrações alegadas em produtos de *Hypericum* comerciais não pode ser assumida como incontestável (GANZERA et al., 2002; WURGLICS et al., 2001). No presente estudo, na ausência de meios para confirmar as concentrações reais de hipericina nos quatro extratos comerciais estudados, trabalhamos assumindo que os seus conteúdos eram aqueles indicados pelos fabricantes (0,3% para os produtos B, C e D, e 0,2% para o extrato A). Como estes valores são razoavelmente uniformes e já que todos os produtos apresentaram atividade farmacológica comparável nos testes animais, não é

possível chegar a qualquer conclusão sobre a importância da hipericina em nosso estudo. Na verdade, não é possível descartar um papel da hipericina na atividade antidepressiva dos extratos estudados, em conjunto com os outros constituintes.

Uma análise mais detalhada dos flavonóides presentes nos extratos que estudamos também teria sido muito interessante. No presente estudo, somente a quercetina e dois de seus principais glicosídeos, a rutina e a isoquercitrina, puderam ser precisamente identificados e quantificados, porque estes eram os padrões que tínhamos disponíveis para teste. Entretanto, três outros glicosídeos derivados da quercetina (todos hidrolisáveis para quercetina) puderam ser identificados pelos seus espectros UV e foram quantificados pela curva de calibração da rutina, baseado no método descrito na literatura (BROLIS et al., 1998; GANZERA et al., 2002). Pela sua localização no eletroferograma (ordem de migração), considerando seu respectivo espectro UV, e levando em conta quais outros glicosídeos da quercetina ocorrem em quantidades significantes no *H. perforatum* (NAHRSTEDT e BUTTERWECK, 1997), inferimos que estes glicosídeos adicionais do grupo flavonol devem incluir o hiperosídeo e a quercitrina. Especificamente, o hiperosídeo mostrou a atividade no TNF, tanto na forma isolada como em frações ricas nesta substância (BUTTERWECK et al., 2000). Entretanto, sem uma substância de referência, a identificação definitiva de qualquer dos glicosídeos flavonóis adicionais fica por ser determinada.

Resumindo, apesar das diferenças significantes no perfil químico dos quatro extratos estudados, todos os produtos apresentaram atividade do tipo antidepressiva comparável. Assim, é impossível fazer inferências quanto à importância de um constituinte químico específico. Entretanto, nossos resultados suportam a hipótese de que o *H. perforatum* possui mais que um princípio ativo e que tanto a hiperforina quanto os flavonóides contribuem para a atividade antidepressiva desta espécie vegetal (BUTTERWECK et al., 2003a). Comparando os perfis fitoquímicos dos produtos A e B, podemos dizer que em cada um deles estes constituintes citados agem quase que independentemente e de maneira similar para promover seu efeito

antidepressivo. Não podemos sugerir, no entanto, qualquer inferência em relação à importância da hipericina para a atividade do tipo antidepressiva dos produtos testados.

Os resultados quantitativos da análise química devem ser entendidos com cautela. A eletroforese capilar (EC) com detectores fotométricos mesmo sendo um método analítico simples e confiável, apresenta uma menor sensibilidade, em modos normais de operação, às mesmas concentrações que outros métodos mais comumente usados, como o HPLC (SIMPSON et al., 2008). Conseqüentemente, uma comparação direta (em termos absolutos) dos resultados obtidos aqui com resultados de outros estudos usando HPLC seria controversa já que as sensibilidades dos métodos são diferentes. Entretanto, há exemplos na literatura científica de estudos (baseados na análise por HPLC, assim como por EC) cujos resultados são compatíveis com os aqui observados. Na Tabela 11 podemos encontrar uma lista de métodos analíticos, constituintes testados e resultados obtidos de alguns estudos que investigaram a composição fitoquímica dos extratos de *H. perforatum*.

Em dois estudos usando a EC, Dogrukol e colaboradores (2001) mediram a concentração de rutina (0,21%) nas partes aéreas da planta, enquanto Urbánek e colaboradores (2002) obtiveram 0,65 – 1,21% de rutina, 0,42 – 0,45% de quercetina e 0,30 – 0,36% de isoquercitrina nas folhas e flores de *H. perforatum*, o que está muito mais alinhado com os resultados obtidos em nosso estudo. Ganzera e colaboradores (2002) analisaram 12 extratos comerciais diferentes de *Hypericum* por HPLC para detecção concomitante de flavonóides, naftodiantronas e hiperforina numa única corrida. Com faixas de concentração de 0,04% - 1,30% de hiperforina, 0,16% - 1,41% de rutina, 0,03 – 0,31% de isoquercitrina e 0,11% - 0,56% de quercetina, estes resultados sugerem uma magnitude similar destes constituintes, em comparação com os nossos resultados de rutina (entre 0,49% e 1,76%), isoquercitrina (entre 0,20 % e 0,38%), quercetina (entre 0,04 e 1,10%) e hiperforina (entre não detectável e 0,76%).

Tabela 11. Resumo dos estudos fitoquímicos do *H. perforatum* e dos seus constituintes analisados.

Autor / ano	Método analítico	Grupo de compostos analisados	Matéria prima analisada	Resultados (relevantes ao presente trabalho)
Butterweck et al., 1997	HPLC	floroglucínóis naftodiantronas flavonóides	extrato LI 160	hiperforina: 0.23 % rutina: 2.33% quercetina: 0.57% isoquercetrina: 0.83%
Dogrukol et al., 2001	EC	rutina	planta (parte aérea)	rutina: 0.21%
Jenson et al., 2001	HPLC	floroglucínóis	2 extratos	hiperforina extrato 1: 3.34% extrato 2: 0.56%
Gerlie et al., 2001	HPLC	floroglucínóis naftodiantronas	2 extratos comerciais	hiperforina 5.8 – 7.2 µg/mL (0.58 – 0.72 %)
Wurglics et al., 2001	HPLC	floroglucínóis naftodiantronas	11 extratos comerciais	hiperforina: <0.2 – 4.34%
Jenson et al., 2002	EC	floroglucínóis naftodiantronas	planta inteira (fresca)	Hiperforina 3.84 – 11.68%
Westerhoff et al., 2002	HPLC	floroglucínóis naftodiantronas flavonóides	5 extratos comerciais	hiperforina: 2.48 - 4.13% rutina: 1.77 – 3.44% hiperosídeo/isoquercetr. 3.10 – 5.11%
Ganzera et al., 2002	HPLC	floroglucínóis naftodiantronas flavonóides	12 extratos comerciais	hiperforina: 0.04 – 0.96 % rutina: 0.16 – 1.41% quercetina: 0.11 – 0.56% isoquercetr.: 0.03 – 0.31%
Urbánek et al., 2002	EC	flavonóides	planta (folhas e flores)	rutina: 0.65 - 1.21% quercetina: 0.42 - 0.45% isoquercetr.: 0.30 – 0.36%
Butterweck et al., 2003	HPLC	floroglucínóis naftodiantronas flavonóides	extrato (planta inteira)	hiperforina: 3.23 % rutina: 1.67% quercetina: 0.32% isoquercetrina: 2.03%
Petzsch et al., 2009	EC	hiperforina flavonóides	4 extratos comerciais	hiperforina: <LOD – 0.76 % rutina: 0.49 – 1.76% quercetina: 0.04 – 1.10% isoquercetrina: 0.20 – 0.38% flavonóides totais: 1.97 – 7.69%

No entanto, deve-se destacar que com relação às concentrações de hiperforina, especialmente, alguns estudos mostraram valores substancialmente mais altos que os obtidos em nosso estudo. Este fato não parece ser dependente do método analítico usado, como mostrado por Jenson e colaboradores (2002), utilizando a EC não-aquosa com fluxo eletro-osmótico reverso, e medindo concentrações de hiperforina e hipericina de 3,84 - 11,68% e 0,036 - 0,121%, respectivamente, em material fresco de *H. perforatum*.

Como já foi dito, a hiperforina é altamente instável (ORTH et al., 1999; BILIA et al., 2001; GANZERA et al., 2002), um fato que pode ser responsável pela grande variação encontrada nas medidas deste composto. Deve-se mencionar neste contexto que no momento da análise fitoquímica (Novembro de 2008), dois dos

extratos testados estavam fora da sua data de validade (extrato B - 03/2008 e extrato C - 09/2008), embora estivessem dentro do prazo de validade quando dos testes farmacológicos. Bilia e colaboradores (2001) mediram a deterioração dos constituintes num período de semanas a vários meses para os extratos de *H. perforatum*, dependendo das condições de empacotamento e armazenamento. É tentador pensar que a margem de estabilidade para um *blister*-individual de extrato seco, quando armazenado apropriadamente (todos os nossos extratos foram armazenados sob refrigeração e na ausência de luz e umidade) é provavelmente muito maior que as indicadas pelas datas de validade dos produtos farmacêuticos. Entretanto, uma perda dos constituintes bioativos, substancial ou não, entre a data da manufatura e a análise química, ou mesmo entre os ensaios farmacológicos e a análise química dos produtos não pode ser descartada. É interessante notar que o produto B, o único extrato com um conteúdo substancial de hiperforina (0,76%) e que acidentalmente foi o único produto que passou do prazo de validade em muitos meses, foi o único produto que veio em uma forma farmacêutica diferente quando comparado aos outros produtos. Os produtos A, C e D, comprados em estabelecimentos comerciais, estavam em comprimidos em *blister* com aparência similar e os excipientes determinados em sua bula, enquanto o extrato B, doado pelo fornecedor, veio em forma de um líquido viscoso em capsúlas gelatinosas, sugerindo um processo diferente de extração / manufatura para este produto.

Estas informações, em conjunto, indicam que o processo de extração / manufatura dos produtos deve desempenhar um papel crucial para alcançar um padrão aceitável de concentrações de hiperforina, e que este fator parece ser mais importante que o empacotamento ou o tempo do produto na prateleira. Como previamente comentado, o extrato B também apresentou um baixo conteúdo de flavonóides, quando comparado aos outros extratos, o que pode também ser atribuído aos mesmos fatores (métodos de extração, empacotamento, estabilidade dos constituintes bioativos). No entanto, exceto para o produto A (ZE 117), nenhum processo de extração foi especificado pelo respectivo fabricante. Adicionalmente, nenhuma informação sobre a composição farmacêutica estava disponível sobre o produto B, o que não nos permite mais considerações a este respeito. Assim, face

aos resultados da análise química, uma comparação detalhada dos processos industriais de extração dos extratos comerciais em paralelo a uma análise de seu perfil químico, assim como estudos de estabilidade dos constituintes dos produtos além do período de validade dos fitoterápicos seria altamente desejável para garantir a alta qualidade dos produtos de *Hypericum* para a terapia antidepressiva.

Por outro lado, é encorajador observar que todos os quatro extratos, destinados ao uso clínico, apresentaram uma atividade farmacológica significativa em testes pré-clínicos para avaliação da atividade antidepressiva, apesar das diferenças em seus perfis químicos. As variações nos constituintes não respondem as questões referentes a qual substância é mais importante para a atividade antidepressiva. Na verdade, estas diferenças confirmaram a importância tanto da hiperforina, quanto dos flavonóides, sugerindo que ambos os constituintes possuem atividade antidepressiva independente e um certo grau de intercâmbio entre estes constituintes, sem comprometer a efetividade do agente terapêutico. Do ponto de vista farmacêutico e de controle de qualidade, entretanto, estas observações levantam aspectos importantes, mostrando a necessidade de mais investigações sobre os processos de extração e a estabilidade dos constituintes das preparações comerciais.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Os quatro extratos comerciais de *Hypericum perforatum* reduziram significativamente o tempo de imobilidade no TSC após o tratamento oral agudo, de acordo com o esperado para drogas antidepressivas.
- Todos os extratos também reduziram significativamente o tempo de imobilidade no TNF após tratamento subagudo, confirmando sua atividade antidepressiva específica.
- No teste do CA, nenhuma diferença significativa foi observada em qualquer dos parâmetros registrados, excluindo qualquer interferência de atividade locomotora no efeito observado.
- Não houve qualquer diferença significativa na atividade antidepressiva entre os produtos.
- Assim, apesar dos perfis químicos diversos, todos os extratos mostraram atividade do tipo antidepressiva comparável.
- Concluimos, então, que tanto a hiperforina, quanto a quercetina e seus derivados, apresentam atividade do tipo antidepressiva *per se* e de igual magnitude.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROSI, M.; MISCHIATTI, S.; HARRASSER, P.C.; SAVIO D.: Oral bioavailability of active principles from herbal products in humans: a study on *Hypericum perforatum* extracts using the soft gelatine capsule technology. *Phytomedicine*, 7 (6): 455-62, 2000.

ALEXANDRE, R.F.; RODRIGUES P.O.; CARDOSO T.M.; SIMÕES C.M.O.: Avaliação das Informações Disponibilizadas na Internet sobre Medicamentos Fitoterápicos à base de *Hypericum perforatum* L. 2004 <http://telemedicina.unifesp.br/pub/SBIS/CBIS2004/trabalhos/arquivos/91.pdf>

ALONSO, J.: Monografia de Hipérico (*Hypericum perforatum* L.). *Fitociência*. 1 (1): 20-29, 1997.

American Herbal Pharmacopeia (AHP) and Therapeutic Compendium: St. John's Wort – *Hypericum perforatum*. HerbalGram, 40, 1997.

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders. American Psychiatric Association; 349. Washington, DC, 2002.

ANVISA, Agência de Vigilância Sanitária – MS/Brasil, http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/alerta/federal/2002/federal_7_02.htm

ARNOLD, A.H.; GULUMIAN, M.: Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda. *J Ethnopharmacol* 12: 35–74, 1984.

BACH-ROJECKY, L.; KALODERA, Z.; SAMARZIJA, I.: The antidepressant activity of *Hypericum perforatum* L. measured by two experimental methods in mice. *Acta Pharm.* 54, 157-162, 2004.

BAUREITHEL, K.H.; BUTER, K.B.; ENGESSER, A.; BURKARD, W.; SCHAFFNER, W.: Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. *Pharm Acta Helv*; 72 (3): 153-7, 1997.

BEERHUES, L.: Hyperforin. *Phytochemistry*, 67(20): 2201-7, 2006.

BHATTACHARYA, S.K.; CHAKRABARTI, A.; CHATTERJEE, S.S.: Activity profiles of two hyperforin-containing *Hypericum* extracts in behavioural models. *Pharmacopsychiat.* 31, suppl., 22-29, 1998.

BHATTERJEE, S.S.; BHATTACHARYA, S.; WONNEMANN, M.; SINGER, A.; MÜLLER, W.E.: Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci* 63: 499-510, 1998.

BIBLER, A.; FISCHER, H.; ROMER, A.; CHATTERJEE, S.S.: Oral bioavailability of hyperforin from *Hypericum* extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl. 1: 36-43, 1998.

BIFFIGNANDI, P.M.; BILIA, A.R.: The growing knowledge of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) drug interactions and their clinical significance. *Current Therapeutic Research*, v. 61, n 7, p. 389-394, 2000.

BILIA, A.R.; BERGONZONI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F.: Evaluation of chemical stability of St. John's Wort commercial extract and some preparations. *Int. J. Pharm.* 213, 199–208, 2001.

BILIA, A.R.; GALLORI, S; VINCIERI, F.F.: St. John's wort and depression - Efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sciences*, 70: 3077–3096, 2002.

BLADT, S.; WAGNER, H.: Inhibition of MAO by fractions and constituents of *Hypericum* extract. *Journal of Geriatric Psychiatry Neurology*: 7, 1: 57-59, 1994.

BLUMENTHAL M.: Herb sales down in mainstream market, up in natural food stores. *Herbalgram*, 55: 60 – 62, 2002.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P.: *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*: 66, 1: 43-68, 1995.

BRANTNER, A.; KARTNIG, T.; QUEHENBERGER, F.: Comparative phytochemical investigations of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum maculatum* Crantz. *Scientia Pharmaceutica*, 62: 261-276, 1994.

BROCKMÖLLER, J.; REUM, T.; BAUER, S.; HUBER, W.D.: Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*, 30 (Suppl 2): 94-101, 1997.

BROLIS, M.; GABETTA, B.; FUZZATI, N.; PACE, R.; PANZERI, F.; PETERLONGO, F.: Identification by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and quantification by highperformance liquid chromatography–UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography A*, 825, 9–16, 1998.

BRONDZ , I.; GREIBROKK, T.; AASEN, A.J.: The relative stereochemistry of hyperforin – na antibiotic substance of *Hypericum perforatum*. *Tetrahedron Letters*. 23: 1299-1300, 1982.

BUCHHOLZER, M.L.; DVORAK, C.; CHATTERJEE, S.S.; KLEIN, J.: Dual modulation of striatal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St John's wort. *J Pharmacol Exp Ther*; 301 (2): 714-9, 2002.

BUFALO, A.C.: Antidepressivo *Hypericum perforatum* L. Sobre o sistema reprodutivo masculino de ratos Wistar, Dissertação de Mestrado, Farmacologia, UFPR, 2007.

BÜTER, B.; ORLACCHIO, C.; SOLDATI, A.; BERGER, K.: Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 64, 431–437, 1998.

BUTTERWECK, V.; BÖCKERS, T.; KORTE, B.; WITTKOWSKI, W.; WINTERHOFF, H.: Long-term effects of St John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. *Brain Res* 930: 21-9, 2002a.

BUTTERWECK, V.; CHRISTOFFEL, V.; NAHRSTEDT, A.; PETEREIT, F.; SPENGLER, B.; WINTERHOFF, H.: Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sciences*, 73, 627-639, 2003a.

BUTTERWECK, V.; JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A.; WINTERHOFF, H.: Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med*; 66: 3-6, 2000.

BUTTERWECK, V.; KORTE, B.; WINTERHOFF, H.: Pharmacological and endocrine effects of *Hypericum perforatum* and hypericin after repeated treatment. *Pharmacopsychiatry*; 34 Suppl. 1: S2-7, 2001a.

BUTTERWECK, V.; LIEFLÄNDER-WULF, U.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A.: Plasma levels of hypericin in presence of procynidin B2 and hyperoside: a pharmacokinetic study in rats. *Planta Med*; 69(3): 21-9, 2003b.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A.; EVANS, J.; HUFSEISEN, B.; ERNSBERGER, P.; ROTH, B.L.: *In vitro* receptor screening of pure constituents of St John's wort reveals novel interaction with a number of GPCR's. *Psychopharmacology*; 162: 193-202, 2002b.

BUTTERWECK, V.; PETEREIT, F.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A.: Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med*; 64: 291-4, 1998.

BUTTERWECK, V.; WALL, A.; LIEFLÄNDER-WULF, U.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A.: Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*; 30 Suppl. 2: 117-24, 1997.

BUTTERWECK, V.; WINTERHOFF, H.; HERKENHAM, M.: St John's wort, hypericin, and imipramine: a comparative analysis of mRNA levels in brain areas involved in HPA axis control following short-term and long-term administration in normal and stressed rats. *Mol Psychiatry*; 6: 547-64, 2001b.

BUTTERWECK, V.: Mechanism of Action of St John's Wort in Depression – What is known? *CNS Drugs*; 17(8): 539-562, 2003.

BYSTROV, N.S.; CHERNOV, B.K.; DOBRYNIN, V.N.; KOLOSOV, M.N.: The structure of hyperforin. *Tetrahedron Letters*, v. 32, p.2791-2794, 1975 apud Reichling, J., Weseler, A.; Saller, R: A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, v. 34, s.1, p. 116-118, 2001.

CALAPAI G.; CRUPI A.; FIRENZUOLI F.; CONSTANTINO G.; INTERRERIA G.; CAMPO G.M.; CAPUT A.: Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalon and brainstem of the rat. *J Pharm Pharmacol*; 51: 723-8, 1999.

CAPASSO, G.; GANGINELLA, T.S.; GRANDOLINI, G.: *Phytotherapy: a quick reference to herbal remedies*, Springer-Verlag, Berlin, 2003.

CASS, H.: St. John's wort as an herbal treatment for depression and general considerations for the use of herbs in mental health. *Seminars in Integrative Medicine*, v. 1, n. 4, p. 191-198, 2003.

CERVO, L.; ROZIO, M.; EKALLE-SOPPO C.B.; GUIZO, G., MORAZZONI, P.; CACCIA, S.: Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* extracts. *Psychopharmacology*; 164(4): 423-8, 2002.

CHATTERJEE S.S.; BHATTACHARYA S., WONNEMANN, M.; SINGER, A.; MÜLLER, W.E.: Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci*; 63: 499-510, 1998.

ÇIRAK, C.; SAGLAM, B.; AYAN, A.K.; KEVSEROGLU, K.: Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some *Hypericum* species from Turkey during the course of ontogenesis. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 1-13, 2006.

COTT, J.M.: In vitro binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract. *Pharmacopsychiatry*; 30 Suppl. 2: 108-12, 1997.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A; LUCKI, I.: Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*; 23 (5): 238-45, 2002.

DAUDT, R; VON POSER, G.L.; NEVES, G.; RATES, S.M.: Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from south Brazil. *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 344-346, 2000.

DONG, Y.: Capillary electrophoresis in food analysis. *Trends Food Science and Technology*, v.10, p.87-93, 1999.

DE VRY, J.; MAUREL, S.; SCHREIBER, R.; DE BEUN, R.; JENTZSCH, K.R.: Comparison of *Hypericum* extracts with imipramine and fluoxetine in animal models of depression and alcoholism. *Eur Neuropsychopharmacol*; 9: 461-8, 1999.

DOGRUKOL-AK, D.; KIRIMER, N.; TUNCEL, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y.: Determination of rutin in *Hypericum perforatum* extract by capillary electrophoresis *Analytical Letters* 34 (2), p: 185-191, 2001.

ECKERT, G.P.; KELLER, J.H.; JOURDAN, C.; KARAS, M.; VOLMER, D.A.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; MÜLLER, W;E.: Hyperforin modifies neural membrane properties *in vitro*. *Neurosci Lett*; 367 (2): 139-43, 2004.

EISENBERG, D.; DAVID, R.B.; ETTNER, S.L.: Trends in alternative medicine use in the United States; 1990 – 1997. *JAMA*; 280 1569-1575, 1998.

ELLINGWOOD, F.: *American Materia Medica. Therapeutics and Pharmacognosy*. Evanston, Illinois. Ellingwood Therapeutist, 1919.

ERDELMEIER, C.A.J.: Hyperforin, possible the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 31 suppl. 1, p 2-6, 1998.

ERNST, E.: The efficacy of Herbal Medicine – an overview. *Fundamental and Clinical Pharmacology*; 19, 405 – 409, 2005.

ESCOP. Monograph of Saint John's Wort. European Scientific Cooperative for Phytomedicine, The Netherlands, Meppel, 1996.

FORNAL, C. A.; METZLER, C. W.; MIRESCU, C.; STEIN, S. K.; JACOBS, B. L.: Effects of standardized extracts of St John's wort on the single-unit activity of serotonergic dorsal raphe neurons in awake cats: comparisons with fluoxetine and sertraline. *Neuropsychopharmacology*; 25 (6): 858-70, 2001.

FRANKLIN, M; CHI, J.D.; MANNEL, M; COWEN, P.J.: Acute effects of LI 160 (extract of *Hypericum perforatum*, St John's wort) and two of its constituents on neuroendocrine responses in the rat. *J Psychopharmacol*; 14 (4): 360-3, 2000.

FRANKLIN, M.; COWEN, P.J.: Researching the antidepressant actions of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in animals and man. *Pharmacopsychiatry*; 34 Suppl. 1: S29-37, 2001.

GANZERA, M.; ZHAO, J.; KHAN, I.A.: *Hypericum perforatum* – chemical profiling and quantitative results of St. John's Wort products by an improved High-Performance Liquid Chromatography method *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 91 (3), 2002.

GASTER, B.; HOLROYD, J.: St John's wort for depression. A systematic review. *Archives of Internal Medicine*; 160,152-156, 2000.

GOBBI, M.; DALLA, F.; VALLE, C.; CIAPPARELLI, C.; DIOMEDE, L.; MORAZZONI, L.: *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 360: 262-9, 1999.

GOBBI, M.; MOIA, M.; PIRONA, L.; MORIZZONI, P; MENNINI, T.: *In vitro* binding studies with two *Hypericum perforatum* extracts – hyperforin, hyperin and biapigenin – on 5-HT₆, 5-HT₇, GABAA/benzodiazepine, sigma, NPY-Y1/Y2 receptors and dopamine transporters. *Pharmacopsychiatry*; 34 (1): p. 45-8, 2001.

GREESON, J.M.; SANFORD, B.; MONTI, D.A.: St. John`s wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, v. 153, p. 402-414, 2001.

GROFF-FUNCK, L.: Determinação de Glutathione e Glutathione Dissulfeto em Farinha de Trigo e Massas de Pão Fresca e Congelada por Eletroforese Capilar. Trabalho de Mestrado, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

GUILHERMANO, L.G.; ORTIZ, L.; FERIGOLO, M.; BARROS, H.M.T.: Commercially available *Hypericum perforatum* extracts do not decrease immobility in rats in the forced swimming test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28, 49-55, 2004.

GUTMANN, H.; BRUGGISSER, R.; SCHAFFNER, W.; BOGMAN, K.; BOTOMINO, A.; DREWE, J.: Transport of amentoflavone across the blood-brain barrier in vitro. *Planta Medica*, v. 68 (9), 804-807, 2002.

HELLER, M.: Trabalho de Conclusão de Curso. Eletroforese Capilar como ferramenta analítica para atestar a autenticidade de uísques nacionais e importados. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

HOAR, W.S.: *General and Comparative Physiology*. 2a Ed., Prentice-Hall Biological Science Series, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, p. 260 – 265, 1975.

HOLMES, P.: *The Energetics of Western Herbs* Vo. 2; Snow Lotus Press, Boulder, 1998.

Hypericum Depression Trial Study Group. Effect of *Hypericum perforatum* (St John`s wort) in major depressive disorder - a randomized controlled trial. *JAMA*, 287,1807-1814, 2002.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01, mar. 2003.

JACKSON, H. C.; NUTT, D. J.: Body temperature discriminates between full and partial benzodiazepine receptor agonists. *European J. Pharmacol.* (2-3): 243 – 246, 1990.

JEAN, D.; POULIGON, M.; HENRIOT, A.C.: Pharmacological Activity of Three Commercial *Hypericum perforatum* Preparations in Mice. *Phytotherapy Research*, 20, 653-654, 2006.

JENSEN, A.G.; HANSEN, S.H.; NIELSEN, E.O.: Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. *Life Sci*; 68: 1593-605, 2001.

JENSEN, A.G.; HANSEN, S.H.: Separation of hypericins and hyperforins in extracts of *Hypericum perforatum* L. using non-aqueous capillary electrophoresis with reversed electro-osmotic flow. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 27, 167–176, 2002.

JOSEY, E. S.; TACKET, R. L.: St John's wort: a new alternative for depression? *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*; 37,111-119, 2002.

JÜRGENLIEMK, G; NAHRSTEDT, A.: Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med*; 68: 88-91, 2002.

KAEHLER, S.T.; SINNER, C.; CHATTERJEE, S.S.; PHILIPPU, A.: Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. *Neurosci Lett*; 262: 199-202, 1999.

KARTING, T.; GRUBER, A.; SAUER, H.: Comparative phytochemical investigations of *Hypericum* species. *Planta Medica*, v. 55, p. 215, 1989.

KELLER, J.H.; KARAS, M.; MÜLLER, W.E.; VOLMER, D.A.: Determination of hyperforin in mouse brain by high-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Anal Chem*; 75 (22): 6084-8, 2003.

KERB, R; BROCKMOELLER, J; STAFFELDT, B; PLOCH, M.; ROOTS, I: Single-dose and steady-state pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin. *Antimicrob Agents Chemother*; 40 (9): 2087-93, 1996.

KIENTSCH, U.; BUERGI, S.; RUEDEBERG, C.; PROBST, S.; HONEGGER, U.E.: St John's wort extract ZE 117 (*Hypericum perforatum*) inhibits norepinephrine and serotonin uptake into rat brain slices and reduces β -adrenoceptor numbers on cultured rat brain cells. *Pharmacopsychiatry*; 34 Suppl. 1: S56-60, 2001.

KING, J: The American Dispensatory 7th edition, King J. The American Dispensatory, 7th edn. Moore, Wilstach & Baldwin: Cincinnati, 1866.

KIST, T. B. L.: Eletroforese Capilar de Zona. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa do Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

KITADA, Y.; MIYAUCHI, T.; SATOH, A.; SATOH, S.: Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. *European Journal of Pharmacology*; 72, 145 – 152, 1981.

KULKARNI, S.K.; DANDIYA, P.C.: Effects of antidepressant agents on open field behaviour in rats. *Psychopharmacology* 33, 333-338, 1973.

KURTH, H.; SPREEMANN, R.: Phytochemical characterization of various St. John's wort extracts. *Adv. Ther.* 15, 117– 128, 1998.

LINDE, K.; BERNER, M.; EGGER, M.; MULROW, C.: St John's wort for depression Meta-analysis of randomised controlled trials *British Journal of Psychiatry*, 186 , 99-107, 2005.

LINDE, K.; MULROW, C.: St John's wort for depression (Cochrane Review). *Cochrane Library*, issue 4. Oxford:Update Software, 1998.

LINDE, K.; RAMIREZ,G.; MULROW, C. et al.: St. John's wort for depression - an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ*, 313, 253-258, 1996.

MAISENBACHER, P; KOVAR, K.A.: Ashyperforin: a homologue of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, v. 58, p. 291-293, 1992.

MANN, J.J.: Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 21, 99–105, 1999.

MENNINI, T.; GOBBI, M.: The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum* *Life Sciences*; 75, 9. 1021-1027, 2004.

MONTGOMERY, S. A.; HUBNER, W. D.; GRIGOLEIT, H.G.: Efficacy and tolerability of St John's wort extract compared with placebo in patients with a mild to moderate depressive disorder. *Phytomedicine*; 7 (suppl. 2), 107, 2000.

MÜLLER, W. E.; ROLLI, M.; SCHAFER, C.; HAFNER, U.: Effects of *Hypericum extract* (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*; 30 Suppl. 2: 102-7, 1997.

MÜLLER, W. E.; SCHAFER, C.: Johanniskraut: *in-vitro* Studie ueber *Hypericum-extrakt* (LI 160), Hypericin und Kaempferol als Antidepressiva. *Dtsch Apoth Ztg*; 136: 17-24, 1996.

MÜLLER, W. E.: Current St John's Wort Research from mode of action to clinical efficacy *Pharmacological Research*; 47, 101-109, 2003.

MÜLLER, W.E.; Singer, A.; Wonnemann, M.: Hyperforin - antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry*; 34 Suppl. 1, 98-102, 2001.

MURRAY, C.L.; LOPEZ, A.D.: Alternative projections of mortality and disability by cause 1990 – 2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349: 1498-1504, 1997.

NAHRSTEDT, A.; BUTTERWECK, V.: Biologically active and other constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 30 Suppl. 2: 129-134, 1997.

NEARY, J.T.; WHITTEMORE, S.R.; BU, Y.; MEHTA, H.; SHI, Y.F.: Biochemical mechanisms of action of *Hypericum* LI 160 in glial and neuronal cells: inhibition of neurotransmitter uptake and stimulation of extracellular signal regulated protein kinase. *Pharmacopsychiatry*; 34 Suppl. 1: 103-7, 2001.

NÖLDNER, M.; SCHÖTZ, K.: Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Medica*, 68, 577-580, 2002.

OSTROWSKI, E.: Untersuchung zur Analytik, ¹⁴C-Markierung und Pharmakokinetik phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. Marburg: University of Marburg, 1988.

ORTH, H.C.J.; RENTEL, C.; SCHMIDT, P.C.: Isolation, Purity Analysis and Stability of Hyperforin as a Standard Material from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, V. 51, 2, 193-200(8), 1999.

ÖZTÜRK, Y.: Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models. *Pharmacopsychiatry*; 30 Suppl. 2: 125-8, 1997.

PAFFRATH, D.; SCHWABE, U. (Ed.): *Arzneiverordnungsreport 2003*, Springer-Verlag, Berlin, 2003.

PANOCCA, I.; PERFUMI, M.; ANGELETTI, S.; CICCOCIOPPO, R.; MASSI, M.: Effects of *Hypericum perforatum* extract on ethanol intake, and on behavioural despair: a search for the neurochemical systems involved. *Pharmacol Biochem Behav*; 66 (1): 105-11, 2000.

PAUWELS, P.J.: Diverse signaling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1743–1750, 2000.

PENG, Y.; CHU, Q.; LIU, F.; YE, J.: Determination of isoflavones in soy products by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, v.87, p.135-139, 2004.

PHILIPPU, A.: In vivo neurotransmitter release in the locus coeruleus-effects of hyperforin, inescapable shock and fear. *Pharmacopsychiatry*; 34 Suppl. 1: 111-15, 2001.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M.: Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*; 47: 379-91, 1978.

PORSOLT, R.D.: Behavioural despair. In: Enna S.J.; Malick, J.B.; Richelson, E.: editors. *Antidepressants: neurochemical, behavioural and clinical perspectives*. New York: Raven Press: 121-39, 1981.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M.: Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732, 1977a.

PORSOLT, R.D.; BERTINI, A.; JALPE, M.: Behavioral despair in mice: a preliminary screening test for antidepressants. *Arch Int. Pharmacodyn*, 229: 327-336, 1977b.

RAFFA, R.B.: Screen of receptor and uptake-site activity of hypericin component of St John's wort reveals S-receptor binding. *Life Sci*; 62 (16): 265-70, 1998.

RODRÍGUEZ-LANDA, J.F.; CONTRERAS, C.M.: A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine* 10: 688–699, 2003.

ROMMELSPACHER, H.; SIEMANOWITZ, B.; MANNEL, M.: Acute and chronic actions of a dry methanolic extract of *Hypericum perforatum* and a hyperforin-rich extract on dopaminergic and serotonergic neurons in rat nucleus accumbens. *Pharmacopsychiatry*; 34 Suppl. 1: S119-S26, 2001.

SÁNCHEZ, C.: The effects of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists on body temperature in male mice. *European J. Pharmacol.*, 171: 202 -206, 1989.

SARRIS, J.: Herbal Medicines in the Treatment of Psychiatric Disorders: A Systematic Review. *Phytother. Res.* 21, 703-716, 2007.

SCHLECHTER, M.D.; CHANCE, W.T.: Non-specificity of "behavioural despair" as an animal model of depression. *Eur J Pharmacol*; 60: 139-42, 1979.

SCHULZ, H.U.; SCHURER, M.; BASSLER, D.; WEISER, D.: Investigation of the bioavailability of hypericin, pseudo-hypericin, hyperforin and the flavonoids quercetin and isohamnetin following single and multiple oral dosing of a *Hypericum* extract containing tablet. *Arzneimittelforschung*; 55 (1): 15-22, 2005.

SERDAREVIC, N.; ECKERT, G.P.; MÜLLER, W.E.: The effects of extracts of St John's wort and kava kava on brain neurotransmitter levels in the mouse. *Pharmacopsychiatry*; 34 Suppl. 1: S134-S6, 2001.

SHELTON, R.C.; KELLER, M. B.; GELENBERG, A. et al: Effectiveness of St John's wort in major depression. A randomized controlled trial. 1978-1986. JAMA, 285, 2001.

SIMMEN, U.; BURKARD, W.; BERGER, K.; SCHAFFNER, W.; LUNDSTROM, K.: Extracts and constituents of *Hypericum perforatum* inhibit the binding of various ligands to recombinant receptors expressed with the Semliki Forest virus system. J Recept Signal Transduct Res; 19: 59-74, 1999.

SIMMEN, U.; HIGELIN, J.; BERGER-BUTER, K.; SCHAFFNER, W.; LUNDSTROM, K.: Neurochemical studies with St John's wort in vitro. Pharmacopsychiatry; 34 Suppl. 1: S137-S42, 2001.

SINGER, A.; WONNEMANN, M.; MÜLLER, W.E.: Hyperforin, a major antidepressant constituent of St John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. J Pharmacol Exp Ther; 290: 1363-8, 1999.

SNYDER, S.: Drugs and the Brain. Scientific American Books Inc., New York, 1986.

STÉRU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P.: The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. Psychopharmacology, 85: 367-370, 1985.

STEVEN, L.; SIMPSON, J.R.; JOSELITO, P: On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis - Fundamentals and applications Journal of Chromatography A, 1184, 504-541, 2008.

TAGLIARO, F.; MANETO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F.P.: A brief introduction to capillary electrophoresis. Forensic Science International, v.92, p.75-88, 1998.

TAVARES, M.F.M.: Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. Química Nova Vol. 19 (2), 173-181, 1996.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.: Herbarium – Compêndio de Fitoterapia. 4ª Edição Revisada. Herbarium Laboratório Botânico, Curitiba – PR, 2001.

TEUFEL-MAYER, R.; GLEITZ, J.: Effects of long-term administration of *Hypericum* extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors. Pharmacopsychiatry; 30 Suppl. 2: 113-6, 1997.

THIEBOT, N.H.; MARTIN, P.; PUECH, A.J.: Animal behavioural studies in the evaluation of antidepressant drugs. Br J Psychiatry Suppl., 160 (15). 44-50, 1992.

THIEDE, H.M.; WALPER, A.: Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* extracts and hypericin. J Geriatr Psychiatry Neurol; 7: S54-S6, 1994.

TREIBER, K.; SINGER, A.; MUELLER, W.E.: Activation of nonselective cation channels by hyperforin: a novel mechanism of antidepressant activity *Soc Neurosci*; 29: 851, 2003.

TRIFUNOVIC, S.; VAJS, V.; MACURA, S.; JURANCIC, N.; DJARMATI, Z.; JANKOV, R.; MILOSAVLJEVIC, S.: Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, v. 49, n.5, 1305-1310, 1998.

UPTON, R.; GRAFF, A.; WILLIAMSON, E.; BUNTING, D.; GATHERUM, D. M.; COTT, J.: St. John's Wort: *Hypericum perforatum*, In: American Herbal Pharmacopoeia T.M. and Therapeutic Compendium, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA, 1997.

URANI, A.; CHOURBAJI, S.; GASS, P.: Mutant mouse models of depression: Candidate genes and current mouse lines. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 805–828, 2005.

URBÁNEK, M.; BLECHTOVÁ, L.; POSPISILOVÁ, M.; POLÁSEK, M.: On-line coupling of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis for the determination of flavonoids in methanolic extracts of *Hypericum perforatum* leaves or flowers *Journal of Chromatography A*, 958, 261–271, 2002.

VEROTTA, L.; APPENDINO, G.; BELLORO, E.; JAKUPOVIC, J.; BOMBARDELLI, E.: Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Natural Products*, 63, p. 412-415, 2000.

VOLZ, H. P.: Controlled clinical trials of *Hypericum extracts* in depressed patients - an overview. *Pharmacopsychiatry*, 30 (suppl. 2), 72-76, 1997.

WAGNER, H.; BLADT, S.: Pharmaceutical quality of *Hypericum* extracts, *Journal of Geriatric Psychiatry Neurology*, 7 suppl 1: p. 65-68, 1994.

WALLACH, M.D.; HEDLEY, L.R.: The effects of antihistamines in a modified behavioural despair test. *Commun Psychopharmacol*; 3: 35-9, 1979.

WATANABE, T.; TERABE, S.: Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 880, p.311-322, 2000.

WESTON, A.; BROWN, P. R.: HPLC and CE: principles and practice. San Diego: Academic Press, 1997.

WILLIAMS, J.W.; MULROW, C.D.; CHIQUETTE, E. et al: A systematic review on newer pharmacotherapies for depression in adults, evidence report summary. *Annals of Internal Medicine*, 132, 743-756, 2000.

WILNER, P.: The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83, 1-16, 1984.

WINTERHOFF, H.; BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. et al.: Pharmakologische Untersuchungen zur antidepressiven Wirkung von *Hypericum perforatum* L. In: Loew, D.; Rietbrock, N.: editors. Phytopharmaka in Forschung und klinischer Anwendung. Darmstadt: Steinkopf Verlag, 39-56, 1995.

WONNEMANN, M.; SINGER, A.; SIEBERT, B.; MÜLLER, W.E.: Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St John's wort. Pharmacopsychiatry; 41 Suppl. 1: S148-S51, 2001.

World Health Organization (WHO): Mental Health 'Depression' http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/, 2006.

World Health Organization (WHO): WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 2, WHO 2004.
<http://www.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/16html>

World Health Organization (WHO): The World Drug Situation. World Health Organization, Geneva, 1988.

WURGLICS, M.; SCHUBERT-ZSILAVECS, M.: *Hypericum perforatum*: A 'Modern' Herbal Antidepressant. Pharmacokinetics of active ingredients. Clin Pharmacokinet; 45(5): 449-468, 2006.

www.chemkeys.com.br/bva/index.htm, acessado em 02.12.2008.

XU, Y.: Capillary electrophoresis. Analytical Chemistry, 67, 12, 463R-473R, 1995.

YU, P.H.: Effect of the *Hypericum perforatum* extract on serotonin selective turnover in the mouse brain. Pharmacopsychiatry; 33: 60-5, 2000.

ZOLLA, C.: Traditional medicine in Latin American, with particular reference to Mexico. J Ethnopharmacol 2:37-51, 1980.